

**UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL**

**INFECTION PAR LE VSV :  
LA CALPAÏNE EST IMPLIQUÉE**

**MÉMOIRE  
PRÉSENTÉ  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE**

**PAR  
CHRISTIAN MORO**

**MARS 2007**

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

## Avant-propos

Il y a déjà quelques années, dans un journal dont j'ai depuis oublié le nom, je suis tombé sur un petit encadré parlant des virus. L'auteur expliquait en quelques lignes que ces « microbes » avaient causé sur Terre, depuis l'apparition de la vie, plus de mortalité que toute autre maladie, accident ou catastrophe naturelle. Ces organismes m'étaient alors à peu près inconnus. Et comme pour la plupart des peurs, les gens ont peur des virus parce qu'ils leur sont inconnus. J'ai donc décidé de comprendre comment ces petites boules de protéines pouvaient être aussi méchantes avec nous et c'est ce qui m'a mené à étudier la biologie.

A la fin de mon baccalauréat, Laurent Poliquin m'a donné la possibilité de jouer avec mon premier virus, le VSV, et j'ai appris là que ces organismes pouvaient non seulement nous nuire, mais également nous apporter des thérapies contre d'autres maladies. Après tout le temps passé à lire sur le sujet et à manipuler en laboratoire, j'ai compris que toute nouvelle découverte ne fait pas que répondre à une question, mais en ouvre une infinité d'autre. Et quelle plus belle occupation pour un être humain que de passer sa vie à s'interroger sur le monde qui l'entoure?

Pour toutes les connaissances que j'ai acquises au cours de ma maîtrise, je tiens à dire un grand merci à Laurent Poliquin pour avoir osé me donner la clé de son laboratoire et à Marc Desforges pour m'avoir initié aux manipulations et m'avoir mis sur la piste de la calpaïne. En plus de ces deux là, je veux remercier tous les gens qui m'ont accompagné au cours de ces sessions : Rose-Marie « Bob » Brito, Etienne Dorval, Jean-Michel Bergeron et Ian Boisseau, mes collègues grâce à qui l'ambiance du laboratoire a toujours été excellente. Un grand merci également à Denis Flipo pour ses connaissances en cytométrie en flux, et à tous les autres qui, d'une manière ou d'une autre, m'ont soutenu dans mes recherches et m'ont permis d'en venir à bout.

# Table des matières

AVANT-PROPOS	ii
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	ix
RÉSUMÉ	xii
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : ETAT DES CONNAISSANCES	4
1.0 Les maladies infectieuses	4
1.1 Les virus	4
1.2 Taxonomie virale	5
1.3 Entrée et réplication	6
1.3.1 L'entrée dans la cellule hôte	6
1.3.2 La réplication virale	7
1.3.3 L'assemblage et le bourgeonnement	8
1.4 Interactions hôte-virus	8
1.4.1 Ciblage du lieu de réplication pour le génome viral	9
1.4.2 Prise de contrôle de la machinerie cellulaire	9
1.4.3 Réponse cellulaire à l'infection virale	10
1.5 Le phénomène de persistance	10
1.6 Le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV)	11
1.6.1 Classification du VSV	12
1.6.2 Structure du VSV	12
1.6.3 Le VSV : apoptose et persistance	14
1.6.4 Le VSV dans l'oncolyse	15
1.7 L'apoptose	15
1.7.1 La voie apoptotique intrinsèque	16
1.7.2 Bax et Bak	17
1.7.3 Le cytochrome c et Smac/DIABLO	17

1.7.4	La voie apoptotique extrinsèque	18
1.7.5	Les caspases	19
1.7.6	Les voies apoptotiques alternatives	20
1.7.7	VSV dans l'apoptose	21
1.8	La calpaïne	21
1.8.1	La calpaïne et le VSV : importance dans les cellules neurales	24
	HYPOTHÈSES DE TRAVAIL	25
	OBJECTIFS	25
	CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES	26
2.0	Lignées cellulaires	26
2.1	Mutants viraux	26
2.2	Infections virales	27
2.3	Inducteur chimique d'apoptose	27
2.4	Inhibiteur de la calpaïne	27
2.5	Extraction protéique	28
2.6	SDS-PAGE, transfert Western et immunobuvardage	28
2.7	Concentration en calcium cytosolique	29
2.8	Changements morphologiques	29
2.9	Analyse densitométrique	30
2.10	Analyse statistique	30
	CHAPITRE III : RÉSULTATS	31
3.0	La protéine pro-apoptotique Bax est clivée en une sous-unité de 18 kDa et la caspase-3 est activée lors de la phase tardive de l'infection par TP6 et T1026.	31

3.1	La calpaïne se trouve dans le cytosol lors de l'infection par TP6.	33
3.2	La calpaïne est clivée lors de l'infection par TP6, mais la concentration en calcium cytosolique ne varie pas significativement.	35
3.3	l'inhibition de la calpaïne ralentit les changements morphologiques induits lors de la phase précoce de l'infection par TP6 sur les cellules H4 et maintient la viabilité de la culture cellulaire.	38
3.4	Les changements morphologiques sont peu marqués lors de l'infection par T1026 et la viabilité est peu influencée.	41
3.5	La procaspase-3 n'est pas clivée par la calpaïne et la forme classique de la fodrine ne se retrouve pas dans les cellules H4 lors de la phase précoce de l'infection par TP6 et T1026.	43
3.6	La forme classique de la fodrine n'est pas exprimées dans les cellules neurales humaines de type H4.	47
3.7	La calpaïne reste stable lors de la phase tardive de l'infection par le VSV.	47
3.8	L'inhibition de la calpaïne à peu d'effet lors de la phase tardive de l'infection par le VSV.	50
CHAPITRE IV : DISCUSSION		55
4.0	Variations dans le patron d'infection entre TP6 et T1026	55
4.1	Le rôle de la calpaïne	58
4.2	La localisation de la calpaïne	58
4.3	L'activation de la calpaïne	59
4.4	La concentration en calcium cytosolique	60
4.5	Les changements morphologiques	60
4.6	La fodrine	61

4.7	La caspase-3 comme témoin	62
4.8	Viabilité cellulaire	63
4.9	Le clivage de Bax	64
4.10	Conclusion	66
RÉFÉRENCES		67



## Liste de figures

<b>Figure 1</b>	La voie apoptotique intrinsèque.	18
<b>Figure 2</b>	Les voies apoptotiques extrinsèques.	19
<b>Figure 3</b>	Modèle des complexes de jonction entre la membrane plasmique et le RE.	23
<b>Figure 4</b>	Bax est clivé lors de l'infection par TP6 et T1026.	32
<b>Figure 5:</b>	La pro-caspase-3 est clivée par les deux mutants TP6 et T1026.	34
<b>Figure 6</b>	Localisation de la calpaïne lors de l'infection par TP6.	36
<b>Figure 7</b>	La calpaïne est clivée lors de la phase précoce de l'infection par TP6.	37
<b>Figure 8</b>	La concentration en calcium cytosolique ne varie pas lors de l'infection par TP6 et T1026.	39
<b>Figure 9</b>	L'inhibition de la calpaïne ralentit les changements morphologiques induits par TP6 lors de la phase précoce de l'infection.	40
<b>Figure 10</b>	L'inhibition de la calpaïne augmente la viabilité des cellules lors de la phase précoce de l'infection par TP6.	42



<b>Figure 11</b>	L'inhibition de la calpaïne a peu d'effet lors de la phase précoce de l'infection par T1026.	44
<b>Figure 12</b>	L'inhibition de la calpaïne n'a pas d'effet significatif sur la viabilité des cellules lors de la phase précoce de l'infection par T1026.	45
<b>Figure 13</b>	La caspase-3 reste stable dans la phase précoce de l'infection par TP6 et T1062.	46
<b>Figure 14</b>	Absence de la forme classique de la fodrine dans les cellules H4 entre 1h et 4h p.i.	48
<b>Figure 15</b>	Absence de la forme classique de la fodrine dans les cellules H4.	49
<b>Figure 16</b>	Stabilité de la calpaïne lors de la phase tardive de l'infection par TP6 et T1026.	51
<b>Figure 17</b>	L'inhibition de la calpaïne à une faible influence sur la viabilité des cellules infectées par TP6 lors de la phase tardive de l'infection.	52
<b>Figure 18</b>	L'inhibition de la calpaïne à une faible influence sur la viabilité des cellules lors de la phase tardive de l'infection par T1026.	54

## Liste des abréviations

(+)	Positif
(-)	Négatif
°C	Degré centigrade
a.a.	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNdb	Acide désoxyribonucléique double brins
ADNsb	Acide désoxyribonucléique simple brin
ADP	Adénosine triphosphate
ARN	Acide ribonucléique
ARNdb	Acide ribonucléique double brins
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNsb-	Acide ribonucléique simple brin négatif
ARNsb+	Acide ribonucléique simple brin positif
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
CARD	<i>Caspase activation and recruitment domain</i>
cm	Centimètre
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPT	Camptothécine
DED	<i>Death effector domain</i>
DMEM	<i>Dulbecco's minimum essential medium</i>

DMSO	Diméthyl sulfoxyde
DIABLO	<i>Direct IAP-binding protein with low pI</i>
g	Gravitation
h	Heure
HA	Hémagglutinine
IFN(s)	Interféron(s)
KDa	Kilo Dalton
MEM- $\alpha$	<i>Minimum essential medium alpha</i>
$\mu$ g	Microgramme
min	Minute
ml	Millilitre
mM	Millimolaire
$\mu$ M	Micromolaire
m.o.i.	<i>multiplicity of infection</i>
MTS/PMS	3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(carboxyméthoxyphényl)-2-(4- ophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt
NCS	<i>Newborn calf serum</i>
NCX	$Na^+/Ca^{2+}$ exchanger
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PARP	Poly(ADP-ribose) polymérase
PBS	<i>Phosphate buffer solution</i>
pH	Potentiel hydrogène
PKR	<i>Protein kinase RNA-dependent</i>

PMSF	Fluorure de phénylméthylsulfonyle
p/s	Pénicilline/streptomycine
p/v	Poids/volume
PVDF	<i>Polyvinylidene fluoride</i>
RE	Réticulum endoplasmique
RNP(s)	Ribonucléoprotéine(s)
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SLN	Signal de localisation nucléaire
Smac	<i>Second mitochondria-derived activator of caspases</i>
SVF	Sérum de veau foetal
T°	Température
TNFR	<i>Tumor necrosis factor receptor</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
VDAC	<i>Voltage-dependent anion channel</i>
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VSV	Virus de la stomatite vésiculeuse
v/v	volume/volume

## Résumé

La faculté du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) à induire l'apoptose dans les cellules tumorales en fait un bon modèle d'étude. Mais contrairement au virus sauvage pour la protéine de la matrice M (TP6), certains mutants de M du VSV, comme T1026, induisent moins fortement l'apoptose. Ils peuvent également persister dans les cellules neurales humaines. Les études préalables ont montré que si la voie apoptotique intrinsèque est impliquée dans la mort cellulaire induite par le VSV, elle ne suffit pas à expliquer la totalité de la mortalité. D'autres voies apoptotiques sont donc impliquées.

La calpaïne est une protéine cellulaire impliquée dans différentes voies métaboliques chez les cellules de vertébrés, dont l'apoptose. Cette cystéine protéase dépendante du calcium est particulièrement importante dans les cellules de type neural. L'infection virale d'une cellule pouvant induire une variation de la concentration en calcium cytosolique, la calpaïne peut être activée dès la phase précoce de l'infection et jouer un rôle à différents niveaux. Une fois activée, elle a la capacité de cliver le fodrine, protéine du cytosquelette, et ainsi participer aux changements morphologiques induits par le VSV. La calpaïne peut également cliver Bax, renforçant la voie apoptotique mitochondriale.

Le rôle de la calpaïne a été étudié ici lors de l'infection *in vitro* par le VSV dans un neurogliome de type H4. L'analyse des protéines totales, extraites lors des phases précoces et tardives de l'infection par TP6 et T1026, ont pu être effectuées par immunobuvardage. De plus, des modifications dans la morphologie des cellules infectées ont été observées par microscopie optique.

La présence de la calpaïne a été décelée dans la fraction cytosolique des cellules H4. Les deux mutants viraux utilisés ont montré un clivage de cette protéase tôt dans l'infection sans toutefois qu'une augmentation de la concentration en calcium cytosolique n'apparaisse. L'inhibition de la calpaïne a provoqué un ralentissement des changements morphologiques induits par TP6, mais le clivage de la fodrine n'a pu être mis en évidence étant donné l'absence de la forme classique de cette protéine dans les cellules H4. L'inhibition de la calpaïne a également permis de diminuer la mortalité cellulaire lors de la phase précoce de l'infection par TP6 (1-4h p.i.). Cependant, cet effet se perd au cours de la phase tardive (16-18h p.i.). Dans le cas de T1026, l'inhibition de la calpaïne n'a pas provoqué de différences, que ce soit dans les changements morphologiques ou dans la viabilité cellulaire. Entre 14h et 18h p.i. la pro-caspase-3 a été clivée, montrant ainsi l'apoptose induite par le VSV, et Bax a également été clivé en une sous-unité de 18 kDa, portion à caractère pro-apoptotique pouvant provenir de l'activité de la calpaïne. Les résultats montrent donc que cette protéase est impliquée dans l'infection par le VSV, tant dans les changements morphologiques que dans la mort cellulaire induits lors de l'infection.



# Introduction

Le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) présente un intérêt grandissant dans la recherche étant donné son activité oncolytique *in vivo* et *in vitro* (Balachandran *et al*, 2001) et sa capacité à induire l'apoptose dans divers types cellulaires. En effet, ce rhabdovirus à ARN simple brin négatif présente différents mutants, son génome étant hautement enclin à être modifié (Desforges *et al*, 2001). Les différents mutants de VSV sont à la disposition des chercheurs et ceux qui nous intéressent ici se caractérisent principalement par une mutation au niveau de la protéine de la matrice M ainsi que par une mutation thermosensible liée ou non à M (Desforges *et al*, 2002). La protéine de la matrice présente un grand intérêt, étant impliquée dans de nombreux mécanismes. De l'assemblage du virion à l'inhibition de la transcription des gènes de l'hôte (Rose et Whitt, 2001) elle participe également à l'induction d'apoptose (Kopecky *et al*, 2001). Les souches mutantes pour M montrent des variations dans l'induction d'apoptose et certains sont capables de persister dans le système nerveux (Desforges *et al*, 2002).

S'il a été montré que les deux sérotypes du VSV, soient Indiana et New Jersey, sont capables d'induire l'apoptose dans les cellules infectées (Balachandran *et al*, 2001), ce virus, lorsqu'il porte une mutation, peut également persister dans le système nerveux de l'hôte (Desforges *et al*, 2002). Ce phénomène de persistance est relié à la capacité du VSV à inhiber l'expression des gènes de l'hôte et à la présence d'une mutation thermosensible non-identifiée sur le génome viral (Desforges *et al*, 2001), ainsi qu'une autre sur M (Ahmed et Lyles, 1998). Il est donc intéressant ici de considérer deux mutants, soient TP6 et T1026, le premier étant un bon inducteur d'apoptose ne montrant pas de persistance *in vitro* alors que le deuxième montre une activité apoptotique moins efficace et une capacité à persister (Desforges *et al*, 2001). Il est donc possible avec des études comparatives de voir un lien entre la voie apoptotique impliquée, menant ou non à la mort cellulaire, et la persistance virale.

Il a été montré que le VSV est capable d'infecter le système nerveux central (Huneycutt *et al*, 1994; Plakhov *et al*, 1995) et éventuellement d'y persister (Barrera et Letchworth, 1996). Ce virus est donc neurotrope et il est important de déterminer le rôle qu'il peut jouer dans le système nerveux de l'hôte lors d'une infection étant donné la possibilité de s'en servir dans le cadre d'une thérapie contre le cancer. La lignée cellulaire H4, de type neurogliome humain, est un bon modèle pour investiguer l'induction d'apoptose par le VSV dans les cellules neurales. En effet, ces cellules sont capables de soutenir une infection persistante de certains mutants pour M, comme T1026, pendant une période allant jusqu'à 120 jours alors qu'un mutant comme TP6 tue la totalité des cellules entre 48 et 72 heures post infection (p.i.). (Desforges *et al*, 2002). Il a également été montré que la caspase 3 est impliquée dans la mort des cellules H4 induite par le VSV, ainsi que les caspases 8 et 9, respectivement impliquées dans la voie intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose (Desforges *et al*, 2002). Considérant que la voie intrinsèque est importante lors de l'induction d'apoptose pendant l'infection par le VSV, il est important de confirmer le rôle de Bax dans ce modèle.

Étant donné les différences d'induction d'apoptose en fonction des types cellulaires et des mutants lors de l'infection par le VSV, il est intéressant de chercher quel(s) facteur(s) cellulaire(s) serai(en)t impliqué(s) dans la détermination de la voie apoptotique employée et dans son efficacité. La calpaïne se prête bien à ces recherches à cause de ses multiples possibilités d'action. En effet, la calpaïne est activée par le calcium et certains modèles d'apoptose dans des cellules neurales montrent une forte implication de la concentration de calcium cytosolique dans la mort cellulaire (Reimertz *et al*, 2001; Wang et Xu, 2004; Waring, 2005), concentration augmentant rapidement suite à un stress au niveau de la membrane, comme une infection virale (DeBiasi *et al*, 1999, 2001; Emgard *et al*, 2002; Altnauer *et al*, 2004). La calpaïne est donc un acteur possible dans les premiers stades de l'apoptose des cellules neurales, alors que dans des cellules de type fibroblastique



ou épithélial l'augmentation la concentration en calcium n'a pas été mise en évidence à ce jour.

Le présent projet vise à évaluer le rôle éventuel de la calpaïne dans l'infection des cellules neurales et son implication dans l'apoptose. En effet, l'utilisation de deux mutants, soient TP6 et T1026, et d'une lignée cellulaire neurale humaine de type H4 a permis de mettre en évidence l'implication de la calpaïne lors de l'infection par le VSV.

# **Chapitre I**

## **État des connaissances**

### **1.0 Les maladies infectieuses**

Les maladies infectieuses chez l'homme sont à l'origine de nombreuses recherches, étant donné l'impact qu'elles ont sur la société actuelle. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), ces maladies ont causé, en 2001, 14,7 millions de morts, soit 26% de la mortalité mondiale. Parmi ces maladies, celles causées par des virus sont très importantes. Le SIDA était à lui seul responsable, selon l'OMS en 2001, de la mort de 2,9 millions de personnes. Par ailleurs, l'émergence de nouvelles maladies infectieuses à caractère épidémique, combinée à l'augmentation des voyages et échanges commerciaux internationaux, tend à accroître l'importance et l'impact sur la société humaine des agents infectieux comme les virus.

La recherche scientifique prend donc toute son importance dans un domaine où la connaissance de ces vecteurs de mort peut amener à éviter d'importantes catastrophes humanitaires. Mais avant de chercher des moyens de combattre une infection, il faut découvrir les mécanismes complexes associés à la structure et au cycle de vie d'un agent infectieux comme un virus. La compréhension de ses modes d'action permettra ainsi d'en combattre les effets pernicioeux ou même de se servir des avantages que peuvent procurer certains virus.

### **1.1 Les virus**

Les virus font partie d'une classe bien particulière des agents infectieux. En effet, leur incapacité à se reproduire par eux-même les place à la limite du monde du

vivant. Leur seule stratégie possible pour se développer consiste donc à infecter un hôte de manière à se servir de sa machinerie cellulaire afin de se reproduire.

Un virus consiste principalement en une capside protéique, parfois entourée d'une enveloppe, et contenant le matériel génétique viral, qu'il soit constitué d'acide ribonucléique (ARN) ou d'acide désoxyribonucléique (ADN). Un virion doit donc faire appel à une stratégie particulière pour insérer son génome dans une cellule hôte et prendre le contrôle de celle-ci. Il lui faut ensuite détourner la capacité de réplication des acides nucléiques et de production de protéines cellulaires vers le matériel génétique viral pour ensuite constituer de nouveaux virions qui seront relâchés par la cellule infectée. La stratégie d'infection varie énormément selon le type de virus considéré, son génome et les protéines nécessaires à sa survie.

## 1.2 Taxonomie virale

La virologie est une discipline relativement récente, débutant avec le 20<sup>ème</sup> siècle. A ce moment, les virus étaient distingués des autres organismes de par leur capacité à traverser des filtres retenant les plus petites bactéries. Étant donné la grande variété de virus, les premières classifications se basaient sur les symptômes induits par ces agents infectieux. Les techniques de recherche s'affinant avec le temps, comme l'apparition de la microscopie électronique, les virus ont pu être classés en fonction de leur structure, principalement d'après la géométrie de leur capside. De nos jours, une combinaison de facteurs permet de classer les virus, et leur taxonomie est basée principalement sur leur génome. En effet, le matériel génétique d'un virus peut varier d'une famille à l'autre, et ces différences sont importantes dans la stratégie développée par le virus pour assurer son cycle de réplication. Ces agents infectieux peuvent donc se regrouper selon que leur génome est constitué d'ADN double brin (ADNdb), ADN simple brin (ADNsb), ARN double brin (ARNdb), ARN simple brin positif (ARNsb+), ARN simple brin négatif (ARNsb-), voir même d'ADN circulaire. Ils peuvent également être pourvus d'une bicouche lipidique ou enveloppe, ajoutant ainsi un facteur de classification (Condit, 2001).

### **1.3 Entrée et réplication**

Comme mentionné ci-dessus, les différentes familles de virus ont des stratégies variables pour assurer leur cycle vital, et ce dépendamment de leur structure et de leur génome. Mais avant de mettre en avant des particularités dans la réplication virale, il faut que le virion, quel qu'il soit, puisse s'attacher et pénétrer dans la cellule cible. Une fois son matériel génétique libéré dans la cellule hôte, les protéines virales seront produites, le génome répliqué et l'assemblage de nouveaux virions pourra avoir lieu. Ces nouveaux virions seront ensuite relâchés dans le milieu extracellulaire par bourgeonnement. Ce sont ces étapes qui forment le cycle vital d'un virus.

#### **1.3.1 L'entrée dans la cellule hôte**

La première étape de l'infection est l'entrée du virion dans la cellule hôte. Cela se fait par l'attachement de protéines virales à un récepteur spécifique de la membrane cellulaire, parfois accompagné d'un co-récepteur. Ces protéines cellulaires sont les déterminants du tropisme viral, menant à l'infection de types cellulaires spécifiques selon le virus considéré. Par exemple, le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) cible les cellules portant un récepteur CD4 à leur surface, et les co-récepteurs impliqués varient selon la lignée de VIH, parmi des récepteurs à chémokines CC ou CXCR4. Une fois fixé au récepteur, il existe différents mécanismes d'entrée dans la cellule, distingués par la dépendance au pH. Le mécanisme indépendant du pH, se déroulant à pH neutre, implique l'entrée du virion directement à la membrane plasmique ou par l'endocytose du complexe virion-récepteur. Le mécanisme dépendant du pH implique lui une acidification de l'endosome facilitant le relâchement du virus dans la cellule. L'endocytose peut avoir lieu de manière dépendante ou indépendante de la clathrine, protéine tapissant l'intérieur des vésicules d'endocytose (Young, 2001).

Les familles de virus ont évolué en utilisant une grande variété de récepteurs cellulaires pour leur entrée dans la cellule cible. Toutefois, des virus différents montrent une affinité pour les mêmes types de récepteurs cellulaires et cela n'est pas dû au hasard. Il semble en effet, que ces groupes de récepteurs préférentiels aient dirigé l'évolution des virus vers leur utilisation de par leur propriété à faciliter l'entrée du virus dans la cellule. Les facteurs associés à ce phénomène restent encore obscurs, mais la proximité entre le récepteur et la membrane plasmique en est certainement un. D'un autre côté, la présence d'un récepteur dans un microdomaine particulier de la membrane cellulaire peut favoriser la préférence d'un virus pour une protéine cellulaire particulière (Young, 2001).

De plus, l'enveloppe présente autour de certains virus ajoute une étape à l'entrée du virion dans la cellule. En effet, le virus doit fusionner son enveloppe à la membrane cellulaire grâce aux glycoprotéines situées à la surface virale. Ici encore les stratégies diffèrent selon la famille de virus considérée. Le virus Influenza A utilise une protéine nommée hémagglutinine (HA) pour provoquer la fusion dépendante du pH entre son enveloppe et la membrane plasmique, alors que le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) utilise sa protéine G (Young, 2001). Dans tous les cas, que les virus soient enveloppés ou non, l'entrée dans la cellule leur permet de relâcher leur matériel génétique à l'endroit voulu de manière à assurer sa réplication et sa traduction en protéines virales.

### **1.3.2 La réplication virale**

Quel que soit le type de matériel génétique présent dans un virus, il doit se retrouver sous la forme d'un ARN messager (ARNm) pour être traduit en protéines virales. Certains virus ARNs<sup>+</sup> n'ont pas d'étape particulière à suivre, étant donné que leur génome peut servir directement d'ARNm pour la cellule hôte, l'ARNm étant considéré comme positif par définition. Les autres virus à ARN doivent donc passer par une série de modification de leur génome pour arriver à la formation des ARNm nécessaires à assurer leur cycle vital. C'est le cas des rétrovirus qui, malgré leur



génomé ARNsb+ portent dans leur capsidé un transcriptase inverse, permettant le passage à un génomé ADNdb, assurant ainsi leur stratégie d'infection en intégrant leur matériel génétique à celui de la cellule hôte. Ils rejoignent ainsi la majorité des virus à ADN qui doivent importer leur génomé dans le noyau de la cellule hôte pour compléter leur réplication. Ces différentes stratégies mènent toutes à la réplication du génomé viral et à la production de toutes les protéines virales permettant la formation de nouveaux virions (Ball, 2001 et DiMaio et Coen, 2001).

### **1.3.3 L'assemblage et le bourgeonnement**

Une fois les différentes protéines virales produites dans la cellule, elles doivent être assemblées pour former un nouveau virion comprenant le matériel génétique original du virus. Les étapes de l'assemblage font partie des mécanismes les moins bien connus du cycle viral. La machinerie de transport cellulaire est essentielle pour amener les protéines et le génomé viral au lieu d'assemblage. Elle permet de cibler les sites favorables à la formation d'un nouveau virion. Les virus enveloppés ont une étape supplémentaire à effectuer, car leur enveloppe peut se former de différentes manières. En effet, elle peut provenir du réticulum endoplasmique (RE), de l'appareil de Golgi, ou même du noyau ou de la membrane plasmique. Une fois que toutes les parties des virions sont assemblées, ils sont relâchés dans le milieu extracellulaire par bourgeonnement à la membrane plasmique. Certains virus ne provoquent pas la lyse de la cellule à ce moment alors que d'autres, comme le VSV, lysent la cellule hôte en re-larguant les virions nouvellement produits (Hunter, 2001).

## **1.4 Interactions hôte-virus**

Au cours de l'infection, les mécanismes permettant la production de virions dans une cellule hôte entre en conflit avec le métabolisme cellulaire normal. En effet, pour pouvoir répliquer leur génomé et produire les protéines nécessaires, les virus doivent détourner la machinerie cellulaire à leur avantage. Le détournement et

l'utilisation des molécules cellulaires se font aux dépens de la cellule hôte et est la principale cause des effets pathologiques associés à l'infection virale. Les effets cytopathiques principaux subséquents à infection virale sont des changements morphologiques comme l'arrondissement et le détachement du substrat, la lyse de la cellule, la formation de syncytiums et la formation de corps d'inclusion. Ces effets néfastes sont les résultats des étapes nécessaires à la complétion du cycle viral.

#### **1.4.1 Ciblage du lieu de réplication pour le génome viral**

Selon la stratégie de réplication virale, le génome du virus doit être transporté de son lieu d'entrée à un site favorisant sa réplication puis sa traduction. Par exemple, les virus à ADN qui doivent pénétrer dans le noyau ont mis au point divers moyens d'y parvenir. En effet, des produits viraux, comme le Vpr des lentivirus, interagissent avec des importines, ou agissent eux-même comme importines pour accéder au noyau de la cellule hôte. Dans d'autres cas, ce sont des séquences de localisation nucléaire (SLN) présentes sur les protéines virales qui permettent cette entrée. En plus de mener le génome viral à son lieu de réplication, cela permet au virus d'assurer la prise de contrôle de la machinerie cellulaire à ses propres fins (Knipe *et al*, 2001).

#### **1.4.2 Prise de contrôle de la machinerie cellulaire**

A part les virus ARNsb+, les autres doivent procéder à la production d'ARNm *de novo*. Pour cela ils devront utiliser certaines protéines cellulaires comme les facteurs de transcription et la polymérase cellulaire. Ils détournent ainsi les mécanismes cellulaires à leur avantage de différentes manières. La prise de contrôle de la traduction cellulaire est l'un des facteurs principaux de ce détournement, associé à l'inhibition de la transcription du matériel génétique cellulaire (Knipe *et al*, 2001). Certains virus, comme le VSV, inhibent l'expression des gènes de l'hôte pour prendre l'avantage sur la cellule (Ahmed et Lyles, 1998 et Kopecky et Lyles, 2003). D'autres mécanismes cellulaires, comme la traduction et le transport des protéines,



ainsi que la réplication du génome font également partie des cibles métaboliques lors d'une infection virale (Knipe *et al*, 2001).

### 1.4.3 Réponse cellulaire à l'infection virale

Une des principales réponses de l'hôte à une infection virale est la production d'interférons (IFNs). Les IFNs sont groupés en deux types, les IFNs de type I comprenant l'IFN $\alpha$  et l'IFN $\beta$ . Le type II ne comprend que l'IFN $\gamma$ . Une cellule infectée par un virus se met à produire ces IFNs permettant la mise en place d'un état anti-viral chez la cellule et ses voisines (Knipe *et al*, 2001). Cet état se caractérise par un ralentissement de la croissance cellulaire et des modifications au niveau du métabolisme permettant l'induction d'apoptose, évitant ainsi la dispersion du virus. La liaison de l'IFN à son récepteur induit différentes voies métaboliques dont l'activation d'enzymes comme la PKR (*protein kinase RNA-dependent*). Cette dernière permet l'inhibition de la traduction, participant ainsi à l'état anti-viral (Stark *et al*, 1998). La production d'interféron lors d'une infection peut provenir de différents facteurs, comme la présence d'ARNdb (Sen et Ransohoff, 1993).

D'un autre côté l'induction d'apoptose fait partie de la réponse cellulaire à une infection. Certains virus l'induisent et d'autres cherchent à l'inhiber, dépendamment des stratégies de réplication mises en place. L'induction d'apoptose peut survenir par différentes voies et provoque la mort de la cellule infectée, limitant ainsi la dispersion du virus dans l'organisme touché (Knipe *et al*, 2001).

## 1.5 Le phénomène de persistance

Contrairement à une infection aiguë, où le virus est produit rapidement et cause la lyse des cellules, une infection persistante implique un cycle viral non-lytique. D'autre part, les infections aiguës stimulent le système immunitaire et la destruction des cellules infectées par les lymphocytes spécifiques de l'antigène. Dans le cas d'une infection persistante, le virus est souvent associé à la cellule et

peu de glycoprotéines virales sont exprimées à la surface de cette cellule. Les anticorps ne sont donc plus efficaces pour provoquer la lyse de la cellule infectée. Par conséquent, en plus de la stratégie visant à assurer un cycle non-lytique, l'infection persistante implique une réponse immunitaire incapable de détruire le virus ou les cellules infectées (Oldstone, 1991).

Une stratégie virale pour se cacher du système immunitaire se retrouve dans la diminution de l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I). Pour reconnaître et détruire une cellule infectée, les lymphocytes T n'ont besoin que de 1 à 100 complexes CMH-antigène qui soient présent à la surface de la cellule. Certains virus, comme les herpesvirus, sont capables de bloquer la synthèse protéique de la cellule pour se protéger, mais peu de familles de virus ont cette capacité. D'autres ont donc développé la capacité d'inhiber directement la présentation de l'antigène par le CMH dans les cellules infectées (Whitton et Oldstone, 2001).

## **1.6 Le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV)**

Étant donné la simplicité structurale des virus, ils ont longtemps été utilisés pour mettre en évidence les mécanismes cellulaires, comme la production et la maturation des protéines. En effet, il est plus simple de suivre dans une cellule une protéine virale bien définie afin de mieux détailler les voies métaboliques qui mènent à la protéine mature. Le VSV a été l'un de ces virus et la production dans une cellule infectée de sa glycoprotéine a permis d'identifier différents mécanismes cellulaires. C'est notamment sa protéine G qui a servi de modèle dans des études sur la synthèse protéique, l'assemblage et le transport à la surface de la cellule (Rose et Whitt, 2001). Le VSV est donc un virus très bien caractérisé au niveau structural et participe à de nombreuses voies cellulaires. Différents mutants du VSV sont connus et présentent des caractéristiques d'infections différentes. Certains sont de bons inducteurs d'apoptose alors que d'autres peuvent établir une infection persistante (Desforges *et al*, 2001 et Desforges *et al*, 2002). Ce virus permet donc d'étudier

différentes stratégies cellulaires et voies métaboliques et constitue donc un outil de recherche des plus intéressant.

### 1.6.1 Classification du VSV

Le VSV est un membre de la famille des *Rhabdoviridae*. Les membres de cette famille infectent autant les vertébrés que les invertébrés et même les plantes pour certains. Cette famille est divisée en cinq genres : les *vesiculovirus*, les *lyssavirus* et les *ephemerovirus* infectant les animaux, et les *cytorhabdovirus* et les *nucleorhabdovirus* infectant les plantes. Ces virus présentent une forme en balle de fusil d'environ 180 nm de long et 75 nm de large et sont constitués de deux parties principales : le cœur de ribonucléoprotéines (RNPs), contenant le matériel génétique, et l'enveloppe lipidique contenant des projections ou spicules. Le VSV fait partie du genre *vesiculovirus* et est reconnu pour causer des maladies principalement chez les bovins et les chevaux, mais il peut également infecter les porcs et les moutons (Licata et Harty, 2003). Deux sérotypes sont connus, soient VSV-Indiana et VSV-New Jersey, qui montrent des comportements différents dans l'infection (Desforgues *et al*, 2001).

### 1.6.2 Structure du VSV

Le VSV est un virus à ARN négatif simple brin non-segmenté, codant pour cinq protéines virales : 3' N, P, M, G, L 5' (Both *et al*, 1975; Barber, 2004). Comme tous les rhabdovirus, le VSV a un génome simple et compact. Chaque ARNm commence une séquence de départ identique de cinq nucléotides, cap-AACAG, et se termine par la séquence UAUG-poly(A). Il n'y a que deux nucléotides entre deux régions du génome codant pour un ARNm (Rose et Whitt, 2001).

La fonction de la protéine de la nucléocapside (N) est de permettre le stockage du génome de façon très serrée dans la capsid virale. On retrouve une protéine N pour environ 9 nucléotides du génome à ARN du VSV et le complexe N-

ARN interagit avec le complexe de la polymérase P-L pendant la transcription et la réplication. N interagit également avec la protéine de la matrice (M) lors de la formation de la nucléocapside, de sa liaison à la membrane et du bourgeonnement. Il est possible que ce soit le taux de protéine N qui permette la régulation du passage entre la transcription et la réplication (Rose et Whitt, 2001).

En association avec la protéine L, la phosphoprotéine (P) qui forme le complexe transcriptase-réplase-P est une protéine de 265 acides aminés (a.a.) et se trouve dans des formes phosphorylées de diverses manières dans les virions et les cellules. La divergence dans la phosphorylation peut mener à la formation de deux complexes P-L différents, l'un responsable de la transcription et l'autre de la réplication (Rose et Whitt, 2001).

La grande protéine L (L pour *large*) est une protéine de plus de 2,100 a.a. et forme le complexe transcriptase-réplase avec la protéine P, comme mentionné ci-dessus. Sa grande taille reflète ses rôles multiples dans la transcription, la réplication, la formation de la coiffe (*capping*), la méthylation de la portion 5' de la coiffe et la polyadénylation.

La glycoprotéine (G) est une protéine de la membrane d'environ 500 a.a. L'enveloppe du VSV contient autour de 1,200 de ces molécules transmembranaires qui forment 400 spicules trimériques répartis dans l'enveloppe du virion. La protéine G du VSV est synthétisée en un précurseur de 511 a.a. dont une séquence N-terminale de 16 a.a. est clivée après son insertion dans le RE. Elle est glycosylée et joue un rôle important dans l'attachement du virion à la membrane cellulaire et dans la fusion de la membrane. Elle permet également la sortie du virus par bourgeonnement en formant l'enveloppe virale dans la membrane plasmique (Jeetendra *et al*, 2003 et Rose et Whitt, 2001).

La protéine de la matrice (M) est la plus petite et la plus abondante des protéines dans le virion mais présente de nombreuses fonctions. Elle joue un rôle



dans la condensation de la nucléocapside, l'assemblage du virion et le bourgeonnement (Rose et Whitt, 2001). Elle est également impliquée dans l'inhibition de la transcription des gènes de l'hôte (Kopecky et Lyles, 2003; Licata et Harty, 2003 et Rose et Whitt, 2001) ainsi que dans l'induction d'apoptose par le VSV (Kopecky *et al*, 2001).

### 1.6.3 Le VSV : apoptose et persistance

Certaines souches mutantes pour la protéine de la matrice M ont montré une capacité de persistance dans les cellules hôtes alors que d'autres ont une action cytopathique élevée ce qui en fait de bons modèles pour l'étude des mécanismes d'apoptose (Desforges *et al*, 2001). En effet, les différentes mutations, situées sur la protéine M, ou une mutation thermosensible pouvant se trouver sur M ou ailleurs dans le génome, produisent un modèle d'infection différent selon la souche virale qui les porte. La souche mutée du type sauvage Indiana appelée TP6 porte une mutation thermosensible située dans une région autre que celle codant pour M. Cette souche présente une cytopathicité élevée, induisant *in vitro* l'apoptose dans 100% des cellules neurales de type H4 dans les 72 heures (Desforges *et al*, 2002). Par ailleurs, cette souche ne montre pas de persistance dans ces mêmes cellules, ce qui a été montré pour d'autres variants du VSV, comme la souche T1026, comportant, elle, une mutation au niveau de l'acide aminé 51 de la protéine M (Desforges *et al*, 2001).

La protéine de la matrice, ayant été désignée par diverses recherches comme étant responsable de l'induction d'apoptose, fait l'objet d'une grande attention lorsqu'une mutation dans sa séquence modifie son pouvoir apoptotique. Il est donc important de considérer la protéine M comme un facteur majeur de l'induction d'apoptose par le VSV. Toutefois, cette protéine ne suffit pas à elle seule à expliquer le processus de mort cellulaire associé au VSV (Kopecky *et al*, 2001). Il est aussi important de noter le fait que non seulement les différents mutants de VSV montrent des variations dans l'induction d'apoptose, mais le type cellulaire considéré

est aussi important, certains mutants ayant des comportements diamétralement opposés en fonction de la nature des cellules infectées (Kopecky et Lyles, 2003). Il est donc possible d'imaginer l'implication d'un facteur cellulaire interagissant avec la protéine M, de manière directe ou non, mais permettant de moduler la réponse à l'infection.

#### **1.6.4 Le VSV dans l'oncolyse**

La multiplication incontrôlée et l'immortalité des cellules cancéreuses peuvent être induites par de nombreux facteurs génétiques dont une mutation dans le gène suppresseur de tumeur p53 (Crow *et al*, 2004). Lors de la recherche de nouveaux outils contre cette maladie, il est donc nécessaire de tenir compte de ce facteur et l'utilisation de virus capables d'induire l'apoptose dans une cellule sans avoir à passer par l'expression de p53 constitue une voie de recherche très intéressante. Le VSV représente un modèle prometteur dans ces recherches grâce à ses caractéristiques propres dont une induction d'apoptose indépendante de p53. En effet, ce virus a pour grand avantage de s'attaquer principalement aux bovins et chevaux, n'incluant pas l'homme dans ses hôtes de prédilection, bien que pouvant l'infecter. Les infections humaines sont généralement asymptomatiques, mais certains cas ont présenté fièvre, nausées et myalgie (Roberts *et al*, 1999). Ceci assure donc l'utilité d'une thérapie oncolytique basée sur VSV étant donné la très faible proportion d'êtres humains ayant été infectés par ce virus et portant donc des anticorps contre lui. Pour cela, les mécanismes de mort cellulaire induite par le VSV doivent être élucidés de même que les divergences dans le patron d'infection qui caractérisent ses différents mutants.

### **1.7 L'apoptose**

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est un processus naturel menant à la mort d'une cellule par différents facteurs. Elle sert de mode de contrôle dans le renouvellement cellulaire, dans l'élimination des cellules en excès, dans la sélection

de cellules spécifiques, comme c'est le cas pour les lymphocytes T. D'autre part, l'apoptose sert de protection de l'organisme lorsque celui-ci peut être mis en danger par une ou des cellules potentiellement pathogènes, comme une cellule infectée par un virus. La mort cellulaire ainsi induite permet donc à l'hôte d'éviter la propagation du pathogène. Le mécanisme de mort cellulaire programmée met en jeu différentes voies de signalisation parfois bien distinctes menant à la dégradation de la cellule concernée. Selon le modèle étudié, que ce soit pour la sélection cellulaire, une protection de l'hôte ou une infection virale, différentes voies peuvent entrer en jeu, séparément ou encore de manière complémentaire (Crow *et al*, 2004; Gupta *et al*, 2005; Yakovlev et Faden, 2004).

Certains modèles viraux ont montré que l'induction d'apoptose peut être directement liée à l'infection, de même que l'inhibition de la mort cellulaire par le virus. Ces modèles montrent néanmoins de grandes variations de résultats selon le type de virus ou de cellule considérée, montrant bien l'importance des relations spécifiques virus-hôte, dépendantes autant de la stratégie de réplication virale que de défense de l'hôte (DeBiasi *et al*, 2001; Kopecky *et al*, 2001; Kopecky et Lyles, 2003; Licata et Harty, 2003).

### 1.7.1 La voie apoptotique intrinsèque

La voie d'apoptose intrinsèque, ou voie mitochondriale (figure 1), est l'une des voies métaboliques principales menant à la mort de la cellule. La mitochondrie est une organelle cellulaire liée à la production d'énergie et à la mort cellulaire programmée. En effet, la perméabilisation de ses membranes est le facteur menant à l'apoptose par voie intrinsèque. Ce processus est contrôlé par des protéines cellulaires de la famille Bcl-2 qui régulent la perméabilité de la membrane mitochondriale externe et contrôlent le relâchement des molécules pro-apoptotiques séquestrées dans l'espace inter-membranaire de la mitochondrie. Les protéines Bcl-2 et Bcl-XL empêchent la perméabilisation et la sortie des facteurs pro-apoptotiques



alors que Bax et Bak induisent la perméabilisation et la cascade protéique menant la mort de la cellule (Armstrong, 2006).

### 1.7.2 Bax et Bak

Bax est une protéine cytosolique de 21 kDa dans un état inactif dans les cellules au repos. Cette protéine est séquestrée par des interactions avec des facteurs protéiques indépendants de la famille des Bcl-2 comme l'humanine, Ku70 et les isoformes 14-3-3  $\sigma$ ,  $\theta$ ,  $\epsilon$  et  $\xi$ . Lors d'un stimulus pro-apoptotique, Bax subit un changement conformationnel lui permettant de se re-localiser et de s'insérer dans la membrane mitochondriale externe où elle forme un pore (Armstrong, 2006). Bax peut également être clivé en une sous-unité de 18 kDa ayant également un pouvoir pro-apoptotique. Cette sous unité peut être formée par un clivage dû à la calpaïne, une autre protéine cellulaire, et ainsi participer à la voie d'apoptose mitochondriale (Oh *et al*, 2004).

Bak est, quant à elle, une protéine ancrée à la membrane mitochondriale externe dans un complexe avec un canal à anions voltage-dépendant (VDAC). Lors d'un stimulus pro-apoptotique, sa conformation change et provoque son oligomérisation et la formation d'un pore dans la membrane permettant ainsi la sortie des facteurs pro-apoptotiques (Armstrong, 2006).

### 1.7.3 Le cytochrome c et Smac/DIABLO

Lors de la formation de pores dans la membrane mitochondriale par l'action de Bax ou Bak, les facteurs pro-apoptotiques séquestrés à l'intérieur sont relâchés dans le cytosol. Ces protéines peuvent alors activer une cascade enzymatique via les caspases menant à la mort cellulaire. Ces facteurs contenus dans la mitochondrie sont appelés Smac (*second mitochondria-derived activator of caspases*) et DIABLO (*direct IAP-binding protein with low pI*). Ils induisent la formation de

l'apoptosome qui active la caspase-9 puis la caspase-3, menant à la mort de la cellule (Armstrong, 2006).

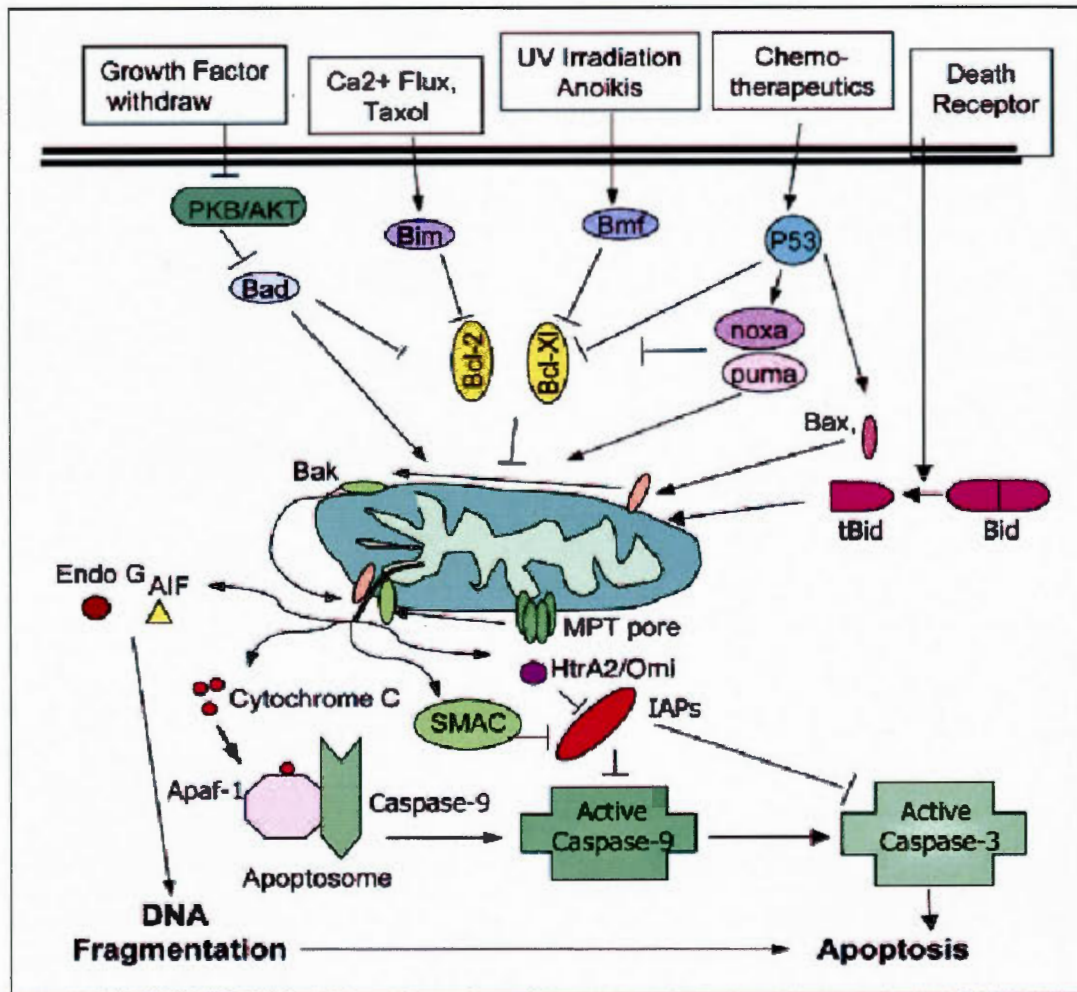


Figure 1 : La voie apoptotique intrinsèque (Jin et El-Deiry, 2005).

#### 1.7.4 La voie apoptotique extrinsèque

La voie extrinsèque (figure 2) est également appelée la voie des récepteurs de mort cellulaire. En effet, les cellules portent à leur surface des récepteurs qui, lorsque liés à leur ligand spécifique, induisent un signal cellulaire menant à la mort de la cellule par apoptose.

Ces récepteurs sont principalement le TNFR (*tumor necrosis factor receptor*), Fas et TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand). Lorsque leur ligand respectif s'y lie, ces molécules transmembranaires subissent des changements conformationnels dans leur portion cytosolique induisant le signal apoptotique. De nombreuses molécules cellulaires sont mises en jeu pour arriver principalement à l'activation de la caspase-8 qui peut, elle, aller activer la caspase-3 (Jin et El-Deiry, 2005).

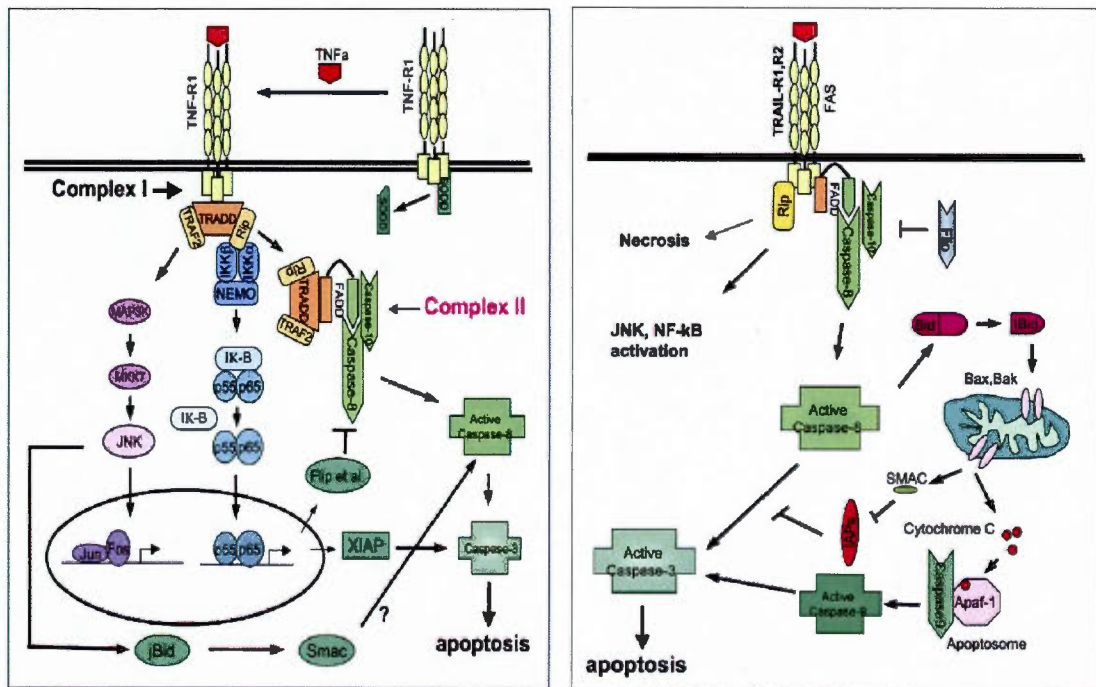


Figure 2 : Les voies apoptotiques extrinsèques (Jin et El-Deiry, 2005).

### 1.7.5 Les caspases

Les caspases sont une famille de cystéine-protéases responsables des principaux événements de l'apoptose. A ce jour, 14 caspases ont été identifiées chez les mammifères, qui présentent des rôles différents dans les voies apoptotiques. En se basant sur leur fonction, il est possible de les classer en trois groupes. Le premier groupe comprend les caspases inflammatoires (caspase-1, -4, -5, -11, -12, -13 et -14) qui sont impliquées dans l'inflammation plutôt que dans l'apoptose. Le deuxième groupe comprend les caspases initiatrices. Ces dernières



possèdent soit un domaine DED (*death effector domain*) (caspase-8 et -10) ou un domaine CARD (*caspase activation and recruitment domain*) (caspases-2 et -9). Elles font le lien entre les molécules de stimulus pro-apoptotique et les caspases du troisième groupe soient les caspases effectrices (caspase-3, -6 et -7). Celles-là sont activées par les caspases en amont de la cascade et assurent les fonctions apoptotiques en aval en clivant de nombreux substrats (Jin et El-Deiry, 2005).

Les cibles des caspases menant à la mort cellulaire sont très variées. Elles peuvent comprendre des protéines apoptotiques comme les caspases effectrices, mais aussi jouer un rôle dans le clivage des protéines structurales affectant la morphologie et les interactions entre cellules, ou entre une cellule et son substrat. D'un autre côté, les caspases peuvent agir au niveau des protéines de réparation de l'ADN comme PARP (poly(ADP-ribose) polymérase), facilitant ainsi la mort de la cellule. Elles peuvent également jouer un rôle dans le clivage de facteurs associés au cycle cellulaire (Jin et El-Deiry, 2005).

#### **1.7.6 Les voies apoptotiques alternatives**

En plus des deux voies dites classiques, de nouveaux modèles existant depuis quelques années ont permis de supposer l'existence de voies alternatives mettant en jeu ou non les caspases. En effet, l'une d'elle, nommée la voie du stress du réticulum endoplasmique, est encore mal connue mais permet de mettre en évidence le rôle de la caspase 12. Activée suite à un stress au niveau du RE, elle est également impliquée dans une cascade de caspases effectrices menant à la mort cellulaire (Kitamura *et al*, 2003; Rao *et al*, 2004).

Par ailleurs, il est question depuis quelques années de la possible implication d'une molécule ne faisant pas partie de la famille des caspases, la calpaïne. Elle pourrait dans certains cas entrer en jeu dans les différentes voies apoptotiques, soit en s'intercalant directement dans une voie déjà décrite en étant alors caspase dépendante (Blomgren *et al*, 2001; Huang et Wang, 2001; McCollum *et al*, 2002;

Wingrave *et al*, 2003), soit de manière indépendante des caspases (Bao *et al*, 2002). Il est toutefois connu que la calpaïne est capable de cliver Bax (Altnauer *et al*, 2004), ce qui en ferait un candidat à la voie intrinsèque, mais pourrait aussi bien jouer un rôle dans le stress du RE et dans l'activation de la caspase 12 (Mandic *et al*, 2003).

#### 1.7.7 VSV dans l'apoptose

Il a été mis en évidence que la voie apoptotique intrinsèque est en cause lors de l'infection par le VSV de même que l'activation de la caspase 3. Toutefois aucune modification de Bax ne semble avoir lieu lors de l'infection par les différents mutants (Desforges *et al*, non-publié). L'utilisation de molécules anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, ainsi que d'inhibiteurs pan-caspases ne permet la survie que de 80% des cellules considérées. La voie apoptotique mitochondriale, de même la caspase-8 et la caspase-9 sont impliquées dans la mort cellulaire programmée induite par le VSV, mais ne constituent pas l'ensemble des voies impliquées (Desforges *et al*, 2002). D'un autre côté, des variations dans l'induction d'apoptose se retrouvent également en considérant différents types cellulaires infectés par différents variants viraux (Desforges *et al*, 2001 et Kopecky *et al*, 2001). Cela signifie donc que le VSV peut être impliqué dans diverses voies apoptotiques lors de l'infection et que la calpaïne est un candidat intéressant.

### 1.8 La calpaïne

La calpaïne fait partie d'un groupe de protéines appelées cystéines protéases calcium-dépendantes. Les connaissances concernant la régulation de son activité cellulaire sont encore floues, mais il est déjà clair qu'elle est impliquée dans une grande variété de mécanismes cellulaires, comme le remodelage de l'attachement entre le cytosquelette et la membrane, différentes voies de transduction de signaux, et l'apoptose (Goll *et al*, 2003).

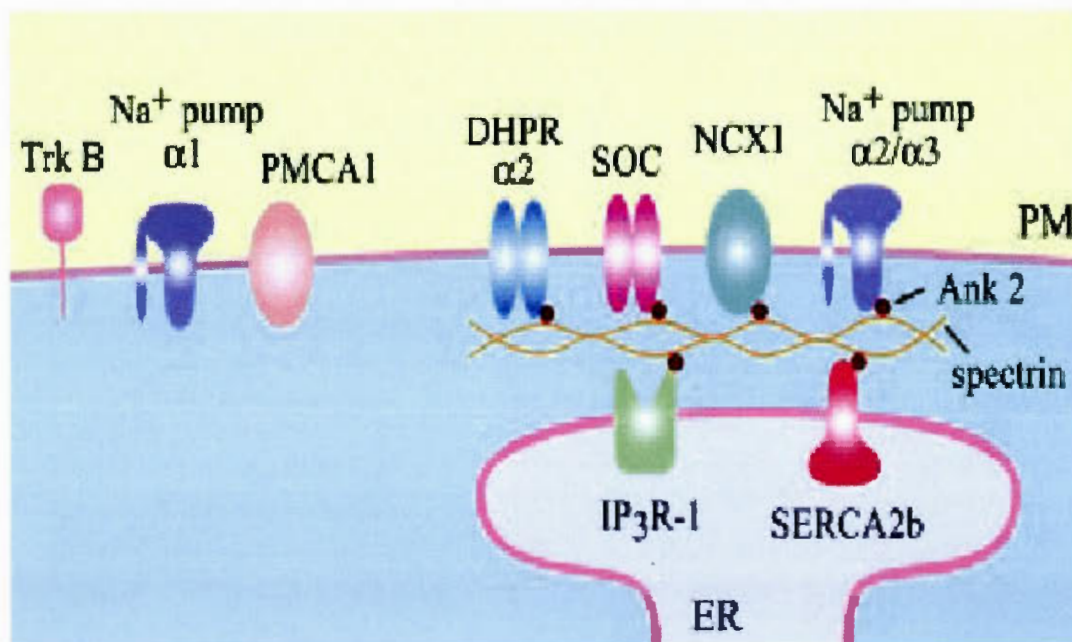
Il existe en fait plusieurs types de calpaïne, dont deux principales différenciées par la concentration en calcium cytosolique nécessaire pour induire leur autolyse : la  $\mu$ -calpaïne ( $[Ca^{2+}]$  nécessaire en micromolaire) et la  $m$ -calpaïne ( $[Ca^{2+}]$  nécessaire en millimolaire) (Huang et Wang, 2001). En effet, les deux calpaïnes se présentent sous la forme d'un hétérodimère composé d'une grande sous-unité de 80 kDa et d'une petite sous-unité de 28 kDa et une modification de la concentration en calcium cytosolique induit l'autolyse, réduisant la masse de la sous-unité de 80 kDa de la  $\mu$ -calpaïne à 76 kDa et celle de la  $m$ -calpaïne à 78 kDa. D'autre part, la même autolyse réduit la masse de la sous-unité de 28 kDa de la  $\mu$ -calpaïne à 18 kDa et celle de la  $m$ -calpaïne à 20.5 kDa. Toutefois, si de nombreuses études ont montré que l'autolyse précède l'activité protéolytique de la calpaïne, d'autres ont montré qu'elle peut être active même sans autolyse. L'autolyse permet donc d'assurer la présence de calpaïnes actives dans la cellule, mais son absence n'implique pas l'inactivité de ces protéases (Goll *et al*, 2003).

Différents tissus ou cellules présentent de grandes variations dans le ratio entre les deux calpaïnes qui se trouvent dispersées dans le cytosol. Toutefois, une stimulation cellulaire induit leur re-localisation en périphérie, probablement par un flux intrinsèque de calcium (Goll *et al*, 2003).

Comme il a été mentionné plus haut, une fois activée, la calpaïne peut exercer son action à de nombreux niveaux. Une de ses fonctions connues est sa capacité à cliver la molécule pro-apoptotique Bax (Altnauer *et al*, 2004). En effet, sachant que la voie apoptotique mitochondriale est impliquée dans le cas du VSV, il est possible de suggérer que la calpaïne y participe en procédant au clivage en sa petite sous-unité de 18 kDa. De plus, si l'activité de la calpaïne reste à préciser, il a été montré que son rôle est important dans différents modèles d'apoptose induite par un virus. C'est le cas pour certains réovirus, où l'inhibition de la calpaïne protège contre l'apoptose induite par ces pathogènes (DeBiasi *et al*, 1999, 2001). D'autre part, d'autres modèles de stress cellulaires non liés à une infection virale ont montré l'implication de la calpaïne dans l'apoptose (McCollum *et al*, 2002; Rajgopal et

Vemuri, 2002; Wang et Xu, 2004). Cela ouvre donc des perspectives intéressantes, sachant que l'attachement d'un virion à la membrane cellulaire lors de l'infection peut induire un stress modifiant la concentration cytosolique de calcium (Cheshenko *et al*, 2003).

La calpaïne peut être également impliquée dans les changements morphologiques associés à une infection virale. En effet, une protéine du cytosquelette, la fodrine, ou  $\alpha$ -spectrine, est un substrat de la calpaïne et se trouve à former un lien entre la membrane plasmique et le RE (Lencesova *et al*, 2003). Étant donné la capacité de la calpaïne à cliver la fodrine en un doublet spécifique de 145-150 kDa (DeBiasi *et al*, 2001; Rajgopal et Vemuri, 2001), il est possible de proposer un lien direct entre une activation de la calpaïne tôt dans l'infection, suite à une augmentation de calcium cytosolique, et les changements morphologiques associés à l'infection par le VSV.



**Figure 3 :** Modèle des complexes de jonction entre la membrane plasmique et le RE (Lencesova *et al*, 2004).



L'hypothèse de l'activation de la calpaïne lors de l'infection par le VSV est renforcée par la présence, au niveau de la membrane plasmique, de microdomaines particuliers. Au niveau de ces sites, les échangeurs d'ions sodium/calcium (NCX pour  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  *exchanger*) permettent l'entrée de calcium dans la cellule. Ils sont également liés à la fodrine et au RE (Lencesova *et al*, 2004; figure 3). L'attachement d'un virion à la membrane plasmique pouvant provoquer la rentrée de calcium dans la cellule, la calpaïne située dans ces microdomaines peut directement agir en clivant la fodrine disponible à proximité. Son action peut donc être ciblée dans des zones bien précises de la cellule infectée.

### **1.8.1 La calpaïne et le VSV : importance dans les cellules neurales**

Un autre aspect important de l'activation de la calpaïne lors de l'infection de VSV est la neurotropie de ce virus. Il a été montré dans diverses études que le rôle de la calpaïne prend toute son importance dans l'apoptose induite chez des cellules de type neural (Blomgren *et al*, 2001; McCollum *et al*, 2002; Wingrave *et al*, 2003). En effet, la concentration en calcium cytosolique est très importante dans le métabolisme de ce type de cellules (Lencesova *et al*, 2003). Différents résultats concernant VSV ayant déjà été montrés sur les cellules neurales H4, elles représentent un bon modèle pour l'étude de l'implication de la calpaïne lors de l'induction d'apoptose calcium-dépendante.

## **Hypothèses de travail**

Étant donné les variations lors de l'induction d'apoptose par différents mutants du VSV, il est possible d'émettre les hypothèses suivantes :

- L'infection par le VSV cause une augmentation du calcium cytosolique dès l'attachement du virion à la cellule.
- La calpaïne est activée par l'augmentation en calcium cytosolique dans la phase précoce de l'infection.
- Une fois activée, la calpaïne peut agir sur la morphologie cellulaire en clivant la fodrine.
- La calpaïne activée peut également agir dans les voies d'apoptose induites par le VSV, notamment dans la voie mitochondriale en clivant Bax.

## **Objectifs**

Les objectifs de cette étude sont de vérifier l'induction d'apoptose par le VSV dans les cellules de type H4 par le clivage de la caspase-3. Le rôle de Bax doit également être pris en compte afin de mettre en évidence le rôle de la calpaïne dans la voie mitochondriale.

L'objectif principal de cette étude est de montrer l'activation de la calpaïne dans la phase précoce de l'apoptose et d'évaluer son rôle. Il s'agit donc de regarder la concentration de calcium cytosolique suite à l'infection, la morphologie des cellules infectées en présence d'un inhibiteur de calpaïne, ainsi que la viabilité des cultures cellulaires infectées en présence de cet inhibiteur.

La fodrine étant un substrat de la calpaïne, elle sert de témoin pour son activation et doit être vérifiée dans le cadre des changements morphologiques.

# Chapitre II

## Matériel et méthodes

### 2.0 Lignées cellulaires

Deux lignées cellulaires humaines sont utilisées ici. La lignée H4, de type neurogliome, permet de représenter l'effet de la calpaïne, mis en évidence par la littérature, dans les cellules neurales principalement (Blomgren *et al*, 2001; McCollum *et al*, 2002; Wingrave *et al*, 2003). La lignée HeLa, de type adénocarcinome épithélial, sert de comparaison en tant que lignée non-neurale. La lignée H4 est cultivée dans du milieu *DMEM* (*Dulbecco's minimum essential medium*) contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et 1% d'antibiotiques pénicilline/streptomycine (p/s), alors que la lignée HeLa est cultivée dans du milieu *MEM- $\alpha$*  (*minimum essential medium alpha*) contenant 10% de sérum de veau nouveau né (NCS pour *newborn calf serum*) et 1% d'antibiotiques (p/s). Ces cellules sont maintenues en atmosphère humide à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>.

### 2.1 Mutants viraux

Deux mutants viraux du sérotype Indiana du VSV sont utilisés ici, selon leur capacité à induire l'apoptose, leur persistance dans les cellules neurales et la présence d'une mutation sur la protéine de la matrice (M). Le mutant TP6, porteur d'une mutation thermosensible non identifiée, est utilisé comme inducteur d'apoptose rapide et efficace dans les cellules H4, ne montrant pas de persistance ni de mutation au niveau de M. Le mutant T1026, qui est un plus faible inducteur d'apoptose dans les cellules H4, permet l'établissement de l'état de persistance et ce variant est porteur d'une mutation au niveau de l'acide aminé 51 de la protéine M (Desforges *et al*, 2001).

## 2.2 Infections virales

Les cellules à infecter sontensemencées dans des boîtes de Pétri de 6 cm de diamètre dans le cas d'une analyse protéique par immunobuvardage, ou en plaque de six puits lors des tests de calcium cytosolique. Les cellules sont comptées et la quantité nécessaire à obtenir 90% de confluence dans les 24 heures estensemencée. Au moment de l'infection, le milieu de culture est retiré et la dilution virale (dans du PBS avec 2% de sérum) nécessaire à avoir une multiplicité d'infection (m.o.i) de 1 ou 10 est ajoutée aux cellules. Après 45 minutes en atmosphère humide à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>, le milieu de culture est ajouté et les cellules sont remises à l'incubateur jusqu'au moment de la récolte. La récolte se fait à l'aide d'un grattoir lors de l'analyse protéique et par la trypsine lors des tests de calcium cytosolique.

## 2.3 Inducteur chimique d'apoptose

De manière à obtenir des témoins d'apoptose, un inducteur chimique est utilisé. La camptothécine (CPT, Sigma), inhibiteur de topoisomérase I induisant l'apoptose par la voie de p53, est utilisée comme contrôle pour la voie mitochondriale. L'inducteur dilué dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO) est ajouté au milieu de culture au même moment que les virus, sans que la concentration finale en DMSO ne dépasse 0,3%. La camptothécine est utilisée à une concentration de 50nM (Desforges *et al*, non publié)

## 2.4 Inhibiteur de la calpaïne

De manière à mettre en évidence l'implication de la calpaïne dans l'infection par le VSV, un inhibiteur de cette protéase, l'Acetyl-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Norleucinal (ALLN, Sigma) est utilisé à une concentration de 25 µM (DeBiasi *et al*, 1999). Il est nécessaire de pré-incuber durant deux heures les cellules traitées avant de procéder à l'infection. Une fois les 45 minutes d'adsorption virale écoulées et le milieu rajouté,

il est nécessaire de ré-incuber les cellules dans une concentration identique de l'inhibiteur pour la durée de l'infection.

## 2.5 Extraction protéique

Pour les extraits protéiques totaux, un tampon RIPA est utilisé [150mM NaCl, 1% NP-40 (v/v), 0.5% deoxycholate (p/v), 0.1% SDS (p/v), 50 mM Tris-HCl pH 8.0] avec 1mM PMSF ajouté frais. Les cellules récoltées sont incubées dans ce tampon pendant 10 min sur glace, avant d'être centrifugées à 10,000 x g pendant 10 min à 4°C. Dans le cas du fractionnement cytosol/mitochondrie, la lyse se fait sur glace avec un tampon digitonine (1mg/ml digitonine, tampon HEPES 20 mM pH 7.4, 250 mM sucrose, 1 mM PMSF) suivie d'une centrifugation de 30 secondes à 14,000 g (T° pièce). Le surnageant représente la fraction cytosolique et est placé sur glace. Le culot est resuspendu dans un tampon de lyse (0,2% Triton X-100 (v/v), 150 mM NaCl, 30 mM Tris-HCl pH7.2, 1mM PMSF) pendant 10 min. sur glace puis centrifugé pendant 15 min. à 4°C et 5,000 g. Le surnageant représente la fraction mitochondriale. La concentration en protéines est dosée en utilisant la trousse Bio-Rad basée sur la technique de Lowry.

## 2.6 SDS-PAGE, transfert Western et immunobuvardage

Après le dosage, les protéines cellulaires (20 µg) sont déposées sur des gels de polyacrylamide de différentes concentrations (15 % pour séparer les faibles poids moléculaires et 8 % pour séparer les hauts poids moléculaires) pour la migration par électrophorèse. Elles sont ensuite transférées sur une membrane de *polyvinylidene fluoride* (PVDF) (transfert en cassette pour les hauts poids moléculaires et en semi-dry pour les faibles poids moléculaires). Les membranes sont placées pour la nuit à 4 °C dans la solution de blocage (PBS – 5% lait en poudre écrémé), avant d'être hybridées avec les différents anticorps utilisés (temps d'hybridation d'une heure pour l'anticorps spécifique et le conjugué).

Ces derniers sont : un anticorps de lapin anti-Bax (dilution 1/2000, BD Biosciences), un anticorps de souris anti-calpaïne (1/1000, Chemicon), un anticorps de souris anti-fodrine (1/1000, Chemicon), la fodrine étant un substrat de la calpaïne spécifique de son activation (DeBiasi et al, 2001; Rajgopal et Vemuri, 2001), un anticorps de lapin anti-caspase-3 (1/500, Santa Cruz Biotechnology) et un anticorps de souris anti-actine (1/5000, Chemicon) utilisé à des fins de témoin de charge. Les anticorps conjugués (1/2000 à 1/10,000) sont des anti-souris ou anti-lapin selon le premier anticorps utilisé. La révélation se fait à l'aide du kit de chemiluminescence ECL+ de la compagnie Amersham.

## **2.7 Concentration en calcium cytosolique**

Le test de calcium cytosolique se fait à l'aide de Fluo-5F/AM (Molecular Probes), ayant une sensibilité correspondant à la concentration de calcium nécessaire à l'activation de la calpaïne. Après avoir été détaché du substrat à l'aide de trypsine et récoltées, les cellules sont resuspendues dans une solution de tampon phosphate (PBS), glucose 5 mM, albumine bovine sérique (BSA) 0.1% (p/v), auquel est ajouté le Fluo-5F/AM dilué dans du DMSO avec 0.2% sulfinpyrazone (Molecular Probes). Les cellules sont incubées 1 h en atmosphère humide à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>, puis centrifugées 10 min à 350 x g et resuspendues dans le milieu précédant de manière à éliminer le Fluo-5F/AM du milieu. Suite à une incubation de 30 min en atmosphère humide à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>, la fluorescence est lue au FACScan. En parallèle, ces mêmes échantillons sont traités à l'iodure de propidium afin d'avoir une lecture de viabilité cellulaire au FACScan.

## **2.8 Changements morphologiques**

Les changements morphologiques associés à l'infection peuvent être analysés au microscope optique. Des photographies numériques prises à différents temps p.i., pour tous les tests effectués, permettent de comparer la morphologie des cellules.



## **2.9 Analyse densitométrique**

Les bandes obtenues par immunobuvardage avec les anticorps spécifiques aux protéines ciblées peuvent être comparées par densitométrie. Ceci est effectué à l'aide du logiciel *Quantity One* (Bio-Rad).

## **2.10 Analyse statistique**

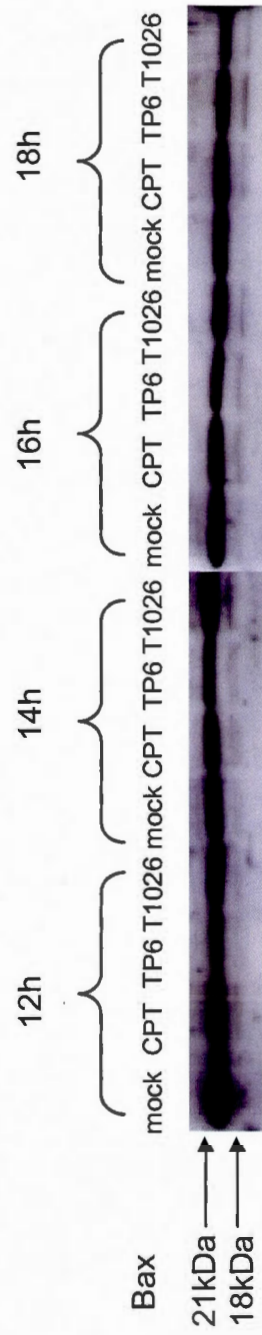
Les résultats de viabilité sont obtenus par le test MTS/PMS. Ce test mesure l'activité des déshydrogénases mitochondriales reflétant l'activité métabolique cellulaire et donc la viabilité d'une culture. Ils sont effectués en triplicatas. Ils ont été soumis à un test statistique pour être évalués. Le test de Student (student's T-test) a été utilisé. Les résultats sont significatifs lorsque la probabilité  $P < 0.05$ .

## Chapitre III - Résultats

### 3.0 La protéine pro-apoptotique Bax est clivée en une sous-unité de 18 kDa et la caspase-3 est activée lors de la phase tardive de l'infection par TP6 et T1026.

Étant donné la mortalité induite par l'infection du VSV dans les cellules neurales, il est nécessaire de vérifier de quelle manière les cellules concernées sont affectées. Il a déjà été montré que TP6 et T1026 sont capables d'induire l'apoptose, bien qu'à des niveaux différents (Kopecky *et al*, 2001). La voie mitochondriale (intrinsèque) est une des voies mise en évidence pour l'induction de mort cellulaire par le VSV et il a été nécessaire de vérifier son implication dans le cas présent. Une protéine pro-apoptotique, Bax, est impliquée dans cette voie et son clivage est directement lié à l'induction de la mort cellulaire programmée. En effet, la portion clivée de 18 kDa est considérée comme tout autant pro-apoptotique que la forme pleine longueur de cette protéine. Lorsque clivée dans le cytosol, la forme de 18kDa peut être relocalisée à la mitochondrie et renforcer la voie intrinsèque induite par la forme pleine longueur de Bax (Oh *et al*, 2004). Pour montrer ce clivage, les cellules H4 ont été infectées par TP6 et T1026, ou traitées à la camptothécine (contrôle positif), un inhibiteur chimique de la topoisomérase I et inducteur d'apoptose (Gajkowska, *et al*, 2004). Les protéines totales ont été extraites entre 12h et 18h p.i. pour être analysées par immunobuvardage à l'aide d'anticorps spécifiques à Bax.

La figure 4 montre clairement l'apparition au cours du temps de la sous-unité clivée de Bax (18 kDa) impliquée dans la voie apoptotique mitochondriale. À 14h p.i., le clivage semble plus fort pour T1026, mais la bande à 21 kDa est également plus marquée. Le clivage n'est donc pas proportionnellement plus fort dans le cas de T1026. Toutefois, ce phénomène est plus marqué dans le cas de TP6 à 18h, ce qui correspond à la faculté de ce variant à induire fortement l'apoptose dans les cellules



**Figure 4: Bax est clivé lors de l'infection par TP6 et T1026.** Les cellules H4 ont été non-traitées (mock), traitées à la camptothécine (CPT) 50 nM ou infectées par TP6 ou T1026 avec une m.o.i. de 10. Les extraits protéiques totaux ont été récoltés aux deux heures, de 12h à 18h p.i., séparés par électrophorèse (SDS-PAGE) et transférés sur PVDF. Bax est révélé à l'aide d'anticorps spécifiques. La camptothécine (CPT) est un inducteur chimique d'apoptose et sert de témoin. Les résultats montrent l'apparition de la forme clivée (18 kDa) de Bax lors de l'induction d'apoptose par la CPT et les deux variants de VSV.

infectées. En ce qui concerne T1026, le clivage de Bax en une bande de 18 kDa est plus faible que pour TP6 et peut se comparer au témoin CPT.

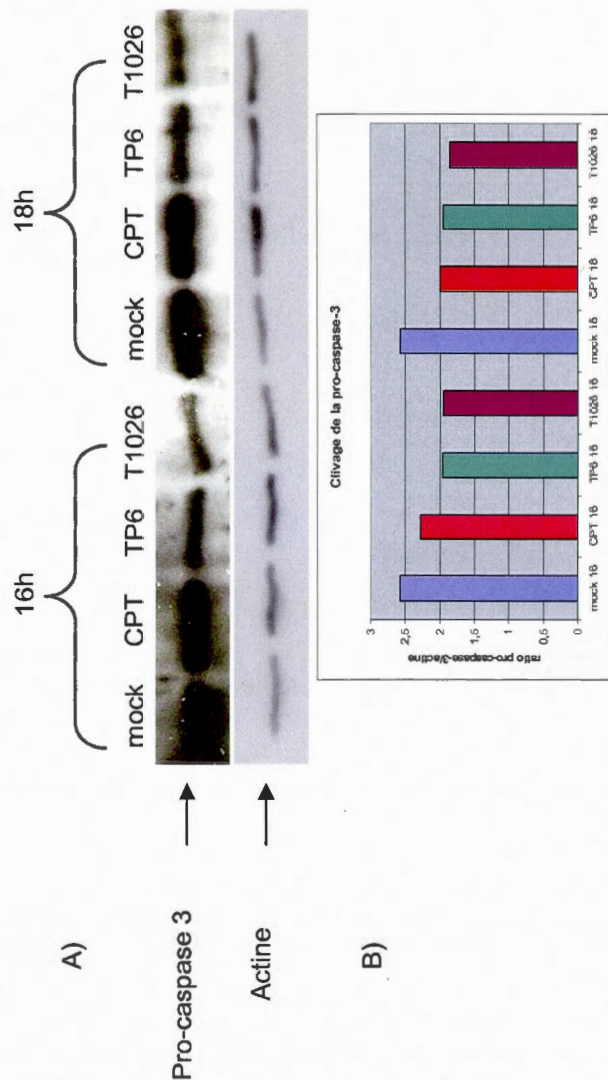
D'un autre côté, il est nécessaire de montrer que la cascade apoptotique est complétée pour atteindre la mort de la cellule concernée. Pour cela, l'activation de la caspase-3 représente un témoin adéquat d'induction d'apoptose. En effet, cette protéase se retrouve en fin de cascade apoptotique dans le cas de différentes voies pouvant être induites (Jin et El-Deiry, 2005). Le clivage de la pro-caspase-3 permet donc de montrer que les cellules infectées ont été tuées par apoptose. La figure 5A montre cela dans le cas de TP6 et de T1026 où la diminution de la bande correspondant à la pro-caspase-3 est bien visible. L'analyse densitométrique présentée en 5B quantifie la même information. Il est donc clair que l'infection par le VSV induit l'apoptose dans les cellules neurales humaines de type H4.

### **3.1 La calpaïne se trouve dans le cytosol lors de l'infection par TP6.**

Une fois montré que l'infection par le VSV induit l'apoptose dans les cellules concernées, il est important de vérifier de quelle manière. Les voies mises en évidence à ce jour, comme la voie mitochondriale, ne suffisent pas à expliquer complètement la mortalité cellulaire induite par ce virus, notamment dans les cellules neurales humaines.

D'autres ouvertures ont cependant été faites au niveau des possibles voies apoptotiques qui fournissent de nouveaux axes de recherche. La calpaïne, une protéase calcium-dépendante, fait partie de ces candidats au rôle pro-apoptotique, principalement dans les cellules neurales. En effet, cette protéine cytosolique ou membranaire joue un rôle dans différents aspects de l'apoptose, selon le modèle étudié (Goll *et al*, 2002). Sa présence dans le cytosol ou dans la mitochondrie peut influencer son rôle dans la voie mitochondriale étant donné sa capacité à cliver Bax (Oh *et al*, 2004). Sa localisation lors de l'infection par le VSV est donc un facteur à prendre en compte.





**Figure 5: La pro-caspase-3 est clivée par les deux mutants TP6 et T1026.** Les cellules H4 ont été non traitées (mock), incubées avec de la camptothécine (CPT) 50 nM ou infectées avec TP6 et T1026 à une m.o.i de 10. Les extraits protéiques totaux (20 µg) ont été récoltés 16 et 18h p.i., séparés par électrophorèse (SDS-PAGE) et transférés sur PVDF. (A) La pro-caspase-3 est révélée à l'aide d'anticorps spécifiques. La camptothécine (CPT) est un inducteur chimique d'apoptose et sert de témoin. L'actine sert de témoin de chargement. Les résultats montrent le clivage de la pro-caspase 3 lors des phases tardives de l'infection par VSV. (B) Analyse densitométrique de (A)

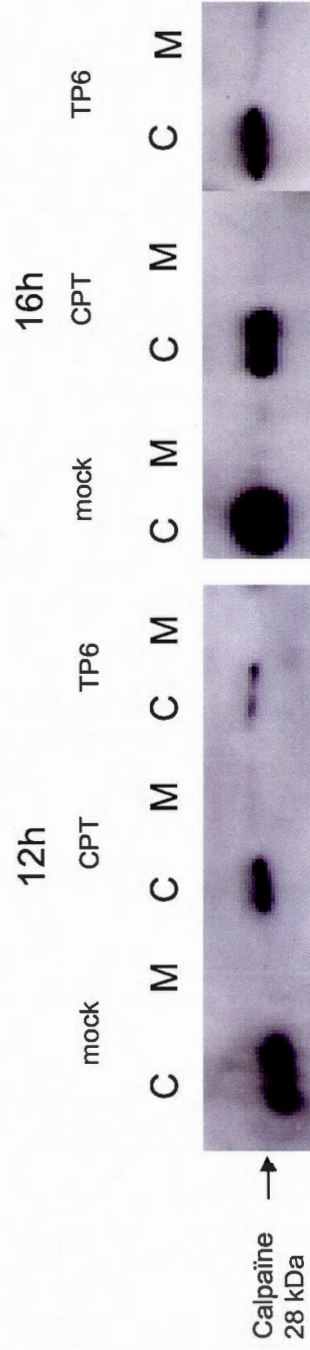
Des cellules neurales humaines de type H4 ont donc été mises en culture et infectées par TP6 ou traitées avec un témoin chimique inducteur d'apoptose, la camptothécine (CPT). L'analyse par immunobuvardage des extraits protéiques fractionnés (cytosol et mitochondrie) a permis de localiser la petite sous-unité de la calpaïne (28 kDa) (figure 6). Il est possible de voir sur cette figure que cette sous-unité se retrouve dans la fraction cytosolique des cellules H4 tant lors de l'infection par TP6 que dans le cas du témoin chimique CPT. De plus, une diminution de la bande de cette sous-unité peut se remarquer dans le cas de l'infection et de la CPT. Cette diminution reflète l'autolyse de la calpaïne lorsqu'elle est activée. L'apparition de faibles bandes dans les fractions mitochondriales à 16h p.i. n'est probablement due qu'à une légère erreur de manipulation.

### **3.2 La calpaïne est clivée lors de l'infection par TP6, mais la concentration en calcium cytosolique ne varie pas significativement.**

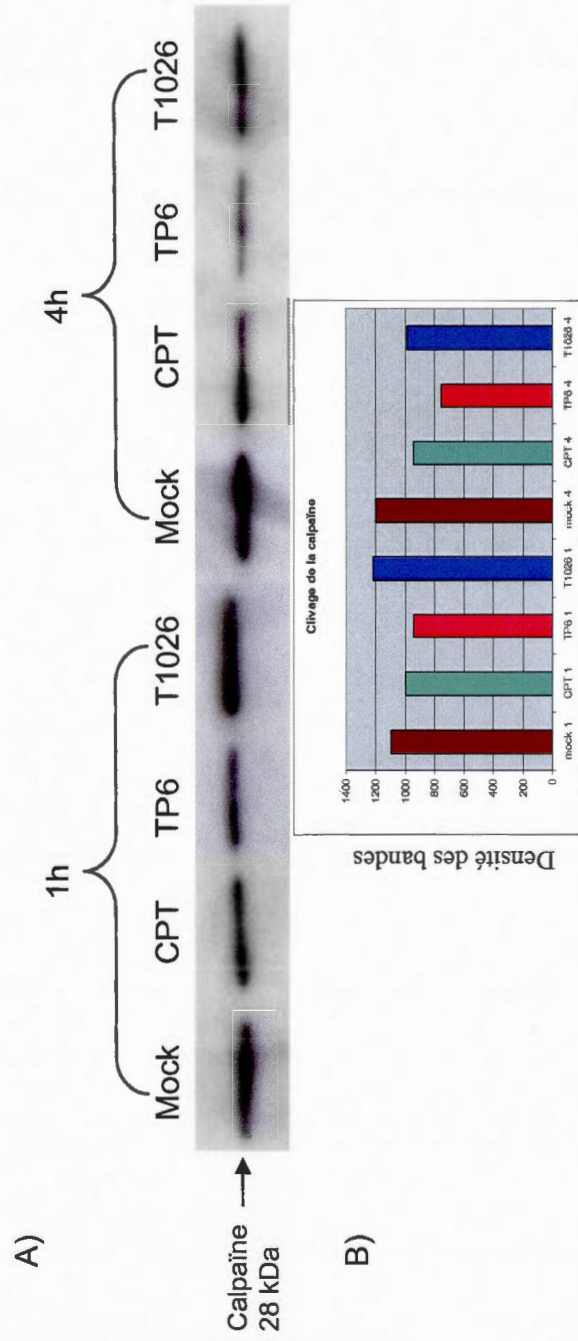
La petite sous-unité de la calpaïne (28 kDa) est une partie active de cette protéase. Son autolyse est une indication de son activité dans différentes voies métaboliques cellulaires, dont l'apoptose. Elle peut toutefois être active sans subir d'autolyse. Son action étant dépendante de la concentration en calcium cytosolique, elle est d'autant plus importante dans le cas des cellules neurales. De plus, son action lors d'une infection virale tend à prendre place lors des phases précoces de l'infection (DeBiasi *et al*, 1999).

Des cellules H4 ont donc été infectées par deux variants viraux, TP6 et T1026, qui diffèrent dans leur vitesse d'induction d'apoptose. Les protéines totales ont été extraites 1h et 4h p.i. de manière à analyser la calpaïne lors de la phase précoce de l'infection. Les résultats à une heure p.i. pour TP6 (figure 7, A et B) semblent déjà montrer une diminution de la petite sous-unité de la calpaïne. Il est également possible de voir sur la figure 7 (A et B) que cette sous-unité est autolysée





**Figure 6: Localisation de la calpaïne lors de l'infection par TP6.** Les cellules H4 ont été non-traitées (mock), traitées à la camptothécine (CPT) 50 nM ou infectées par TP6 à une m.o.i de 1. Les fractions protéiques cytosoliques (C) et mitochondriales (M) ont été récoltées à 12 h et 16 h p.i., séparées par électrophorèse (SDS-PAGE) et transférées sur PVDF. La calpaïne est révélée à l'aide d'anticorps spécifiques. La camptothécine (CPT) est un inducteur chimique d'apoptose et sert de témoin. Les résultats montrent la localisation de la petite sous-unité active de la calpaïne.



**Figure 7: La calpaïne est clivée lors de la phase précoce de l'infection par TP6.** Les cellules H4 ont été non-traitées (mock), traitées à la camptothécine (CPT) 50 nM ou infectées par TP6 ou T1026 à une m.o.i de 1. Les extraits protéiques totaux (20 µg) ont été récoltés 1h et 4h p.i., séparés par électrophorèse (SDS-PAGE) et transférés sur PVDF. (A) La calpaïne est révélée à l'aide d'un anticorps spécifique. La camptothécine (CPT) est un inducteur chimique d'apoptose et sert de témoin. Le chargement est contrôlé par le dosage protéique. (B) Analyse densitométrique de (A). Les résultats montrent que la petite sous-unité active de la calpaïne (28 kDa) est clivée lors de la phase précoce de l'infection par TP6 mais non par T1026.

à 4h p.i. lors de l'infection par TP6 et dans le cas du témoin CPT. Dans le cas de T1026, les résultats présentés sur la figure 7 (A et B) ne montrent pas de clivage à 1h p.i., mais l'analyse densitométrique (figure 7B) pour 4h p.i. présente une diminution de la petite sous-unité de la calpaïne.

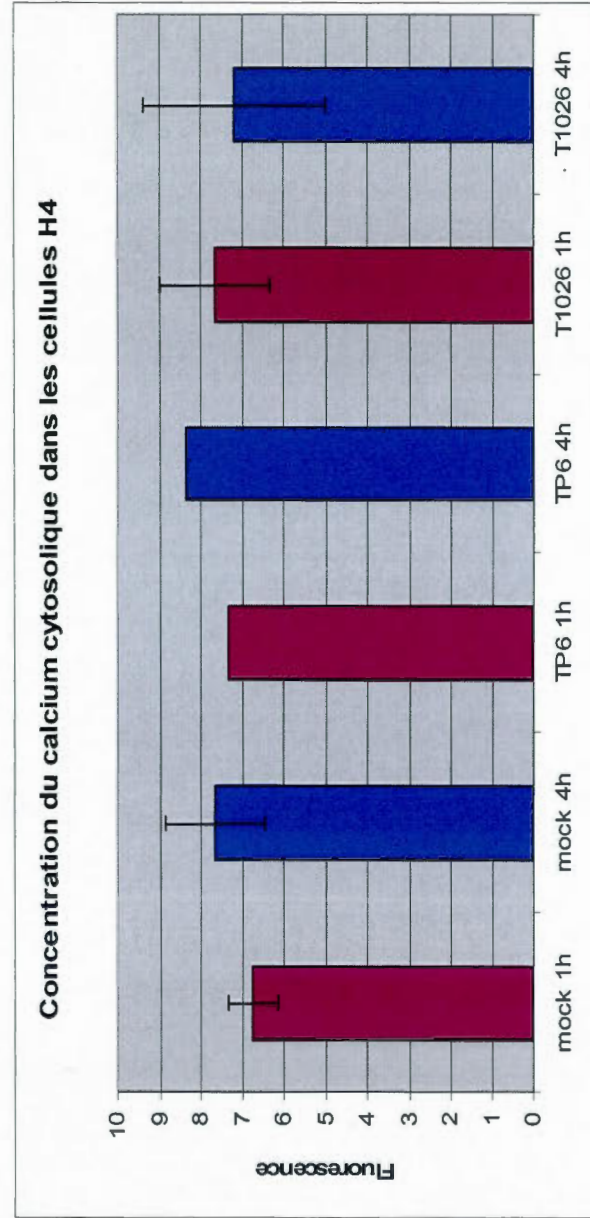
Étant donné la dépendance de la calpaïne au calcium pour être activée, un test de concentration en calcium cytosolique a été effectué. Les résultats obtenus (figure 8) ne montrent toutefois pas de variations majeures dans la concentration en calcium cytosolique des cellules infectées par TP6 ou T1026.

### **3.3 L'inhibition de la calpaïne ralentit les changements morphologiques induits lors de la phase précoce de l'infection par TP6 sur les cellules H4 et maintient la viabilité de la culture cellulaire.**

Le variant TP6 du VSV est un inducteur rapide de l'apoptose et son effet peut se remarquer dès la phase précoce de l'infection (1h-4h p.i.). Il est reconnu que l'un des effets précoces induits par le VSV est une modification dans la morphologie de la cellule infectée, relié à l'induction d'apoptose (Blondel *et al*, 1990). Par ailleurs, la calpaïne a pour substrat une protéine du cytosquelette impliquée dans le maintien de la forme de la cellule : la fodrine. Il est donc intéressant de vérifier l'implication de la calpaïne dans les changements morphologiques induits par TP6.

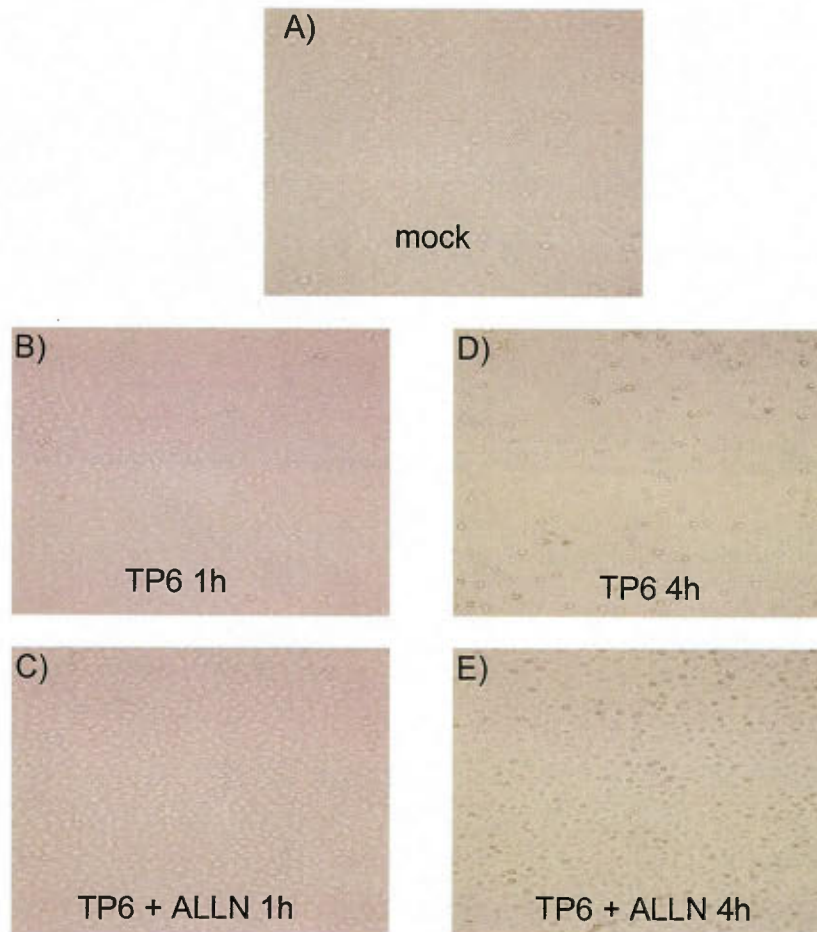
Les cellules H4 ont donc été infectées par ce variant du VSV, avec ou sans un inhibiteur de la calpaïne, l'ALLN. Des photos ont ensuite été prises 1h et 4h p.i. afin d'observer l'aspect morphologique de la culture et un test MTS/PMS a permis d'estimer la viabilité de cette même culture.

L'observation des images présentées à la figure 9 permet de mettre en évidence les changements morphologiques induits par TP6 dans les cellules H4. Les cellules témoin non-infectées (mock, figure 9A) présentent un tapis cellulaire uniforme sans décollement ni arrondissement des cellules en culture. Lors de



**Figure 8: La concentration en calcium cytosolique ne varie pas lors de l'infection par TP6 et T1026.** Les cellules H4 ont été non traitées (mock) ou infectées par TP6 ou T1026 à une m.o.i de 10. La récolte a eu lieu à 1h et 4h p.i. La fluorescence est mesurée au FACs suite à l'ajout de Fluo-5F/AM. La fluorescence représente la concentration en calcium cytosolique. Les résultats ne montrent pas de variation de la concentration en calcium cytosolique.





**Figure 9: L'inhibition de la calpaïne ralentit les changements morphologiques induits par TP6 lors de la phase précoce de l'infection.** Les cellules H4 ont été non-traitées (mock) ou infectées avec TP6 avec une m.o.i. de 10, avec ou sans ALLN 25  $\mu$ M. L'ALLN est un inhibiteur de la calpaïne. Les photos ont été prises 1h et 4h p.i. et leur observation montre les changements morphologiques induits par l'infection ainsi que leur ralentissement lors de l'inhibition de la calpaïne.

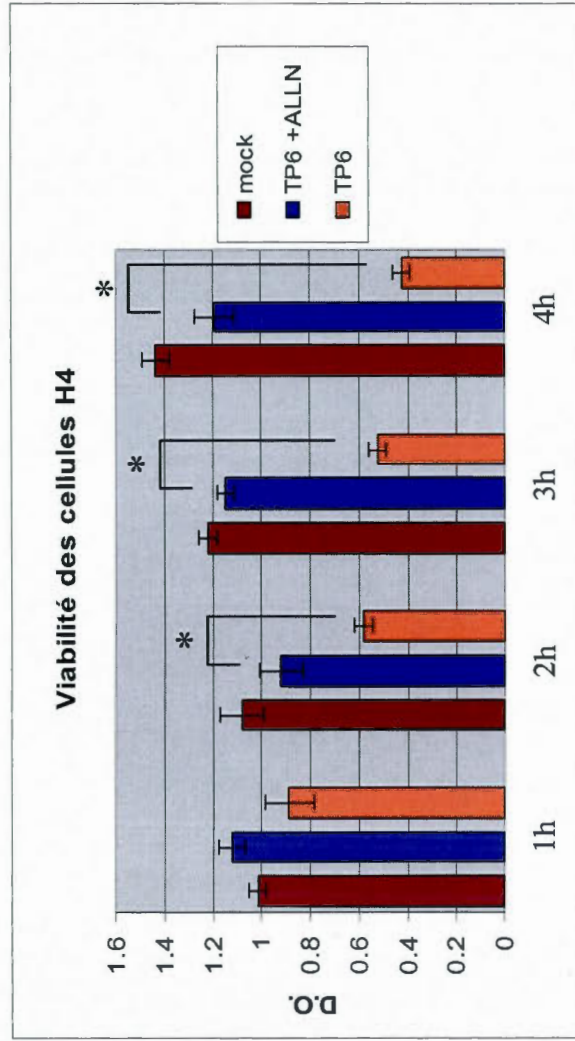


l'infection par TP6, les cellules ne présentent pas de variation à 1h p.i., avec ou sans ALLN (figure 9B et 9C). Par contre, à 4h p.i., les cellules infectées par TP6 (figure 9D) montrent d'importants changements morphologiques en comparaison au témoin. Le tapis cellulaire n'est plus uniforme, de nombreuses cellules ont décollé du substrat et un arrondissement marqué est le témoin de l'influence de TP6 sur la culture cellulaire. Par contre, en observant la figure 9E, il est possible de remarquer que les cellules infectées par TP6 et soumises à l'action de l'ALLN ont gardé une plus grande intégrité morphologique en comparaison de l'infection sans inhibiteur de calpaïne. Le tapis cellulaire est préservé dans ce cas, et l'arrondissement cellulaire est fortement amoindri.

Le test MTS/PMS présenté à la figure 10 est représentatif de l'état des cellules. Cette figure montre que la culture cellulaire témoin (mock) présente une légère croissance au cours du temps, alors que l'infection par TP6 provoque une chute marquée de la viabilité cellulaire dans les quatre premières heures p.i. En parallèle, les cellules infectées par TP6 et soumises à l'effet de l'inhibiteur de calpaïne conservent une bonne viabilité, même si à 4h p.i. la D.O. commence à baisser par rapport au témoin.

### **3.4 Les changements morphologiques sont peu marqués lors de l'infection par T1026 et la viabilité est peu influencée.**

Le variant T1026 du VSV, mutant pour la protéine de la matrice M, est un inducteur d'apoptose moins efficace que TP6. Il a également été montré qu'il peut persister dans les cellules neurales. Les changements morphologiques associés à l'infection étant également retardés en comparaison au VSV sauvage, l'influence de la calpaïne lors de la phase précoce de l'infection (1h-4h p.i.) ne devrait donc pas être aussi marquée que dans le cas de TP6. Les cellules H4 ont donc été infectées par T1026, avec ou sans un inhibiteur de la calpaïne, l'ALLN. Des photos ont ensuite été prises 1h et 4h p.i. afin d'observer l'allure de la culture et un test MTS/PMS a permis d'estimer la viabilité de cette même culture.



**Figure 10: L'inhibition de la calpaïne augmente la viabilité des cellules lors de la phase précoce de l'infection par TP6.** Les cellules H4 ont été non traitées (mock) ou infectées par TP6 avec ou sans ALLN. L'ALLN est un inhibiteur de la calpaïne. Un test MTS-PMS a été effectué chaque heure, de 1h à 4h p.i. La D.O. représente la viabilité de la culture cellulaire. Les résultats montrent la survie des cellules infectées en présence d'ALLN. L'astérisque montre une différence statistiquement significative.

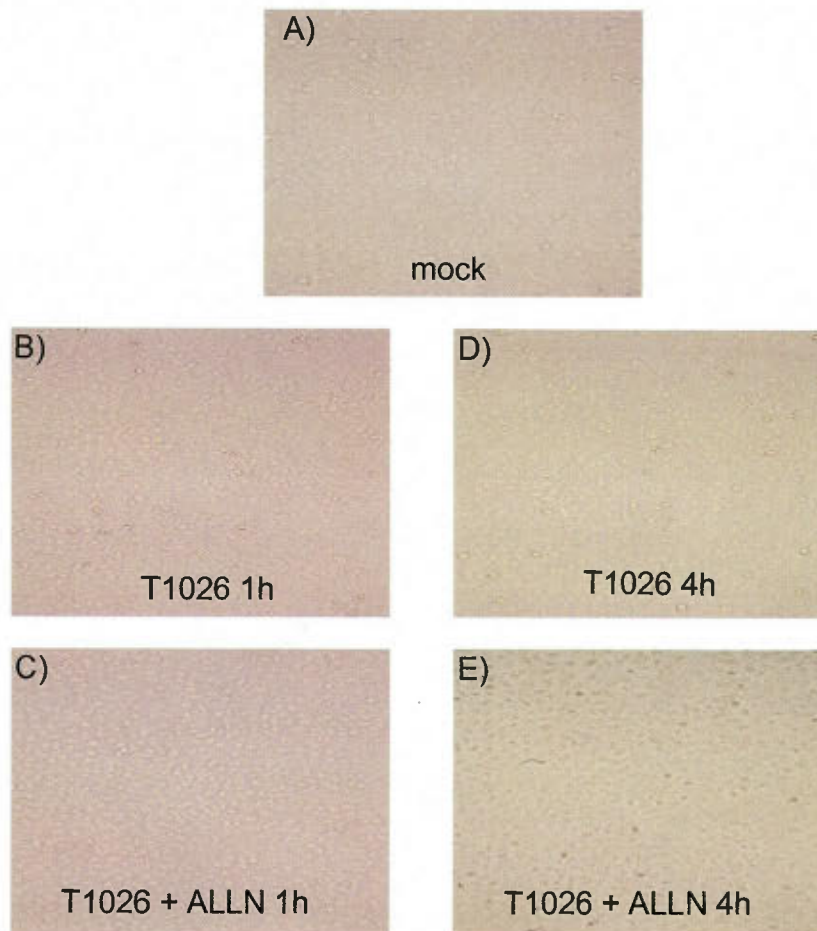
Les observations montrent qu'à 1h p.i., l'influence de T1026 sur la morphologie cellulaire est nulle, avec ou sans inhibiteur de calpaïne (figure 11B et 11C). À 4h p.i. (Figure 11D et 11E) il est possible de remarquer de légers changements morphologiques, comme l'arrondissement d'une minorité de cellules, mais le tapis cellulaire reste intact. L'ALLN ne semble pas avoir d'effet marqué.

En considérant la viabilité de ces cultures (figure 12), aucune différence significative n'est à noter dans les trois premières heures suivant l'infection par T1026. C'est à 4h p.i. que la viabilité de la culture infectée par T1026 commence à baisser et l'ALLN n'a pas d'effet notoire sur cette baisse.

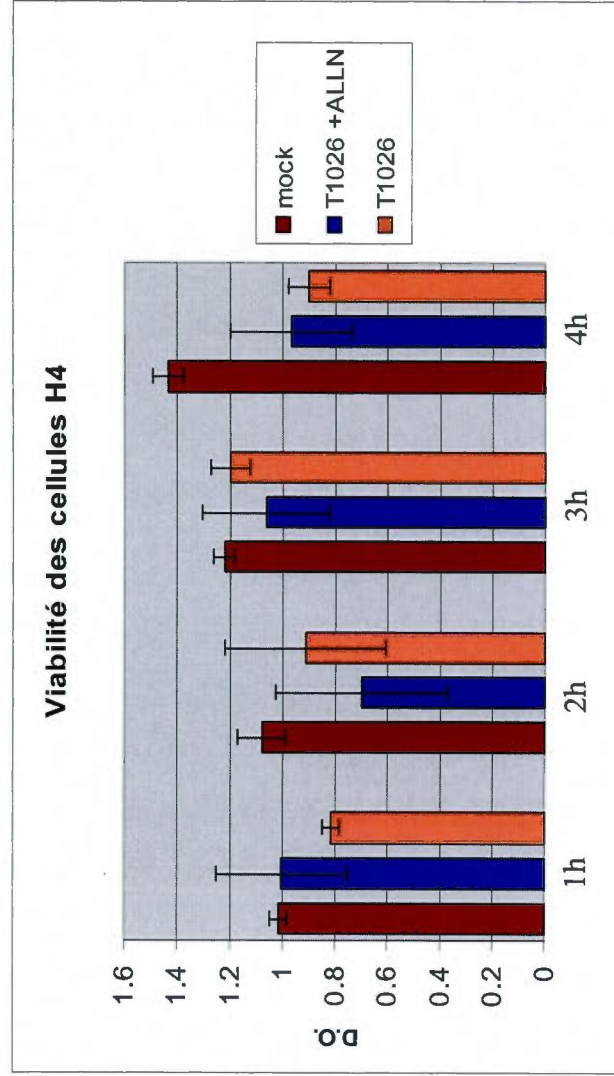
### **3.5 La procaspase-3 n'est pas clivée par la calpaïne et la forme classique de la fodrine ne se retrouve pas dans les cellules H4 lors de la phase précoce de l'infection par TP6 et T1026.**

Différents substrats de la calpaïne peuvent être utilisés pour montrer son activation et la procaspase-3 en fait partie. En effet, la calpaïne peut cliver cette caspase de manière spécifique et donner un fragment de 29 kDa. Ce clivage de la procaspase-3 n'est pas directement lié à l'apoptose mais à l'activité enzymatique de la calpaïne (Emgard *et al*, 2002). Les cellules H4 infectées par TP6 et T1026 ont donc été lysées 1h et 4h après l'infection pour en extraire les protéines totales. L'utilisation d'un anticorps spécifique aux différents fragments de la caspase-3, dont le fragment de 29 kDa dépendant de la calpaïne, a permis d'analyser le clivage de cette caspase. La figure 13 montre toutefois que la procaspase-3 reste intacte lors de la phase précoce de l'infection par les deux variants de VSV, ne présentant ni de fragment de 29 kDa ni d'aucune autre sorte.

Un autre substrat possible pour déterminer l'activation de la calpaïne est la fodrine. Cette protéine du cytosquelette est un des substrats préférentiels de la calpaïne ce qui lui permet d'agir sur la morphologie cellulaire au niveau du cytosquelette. Lorsque la forme classique de la fodrine (240 kDa) est clivée par la

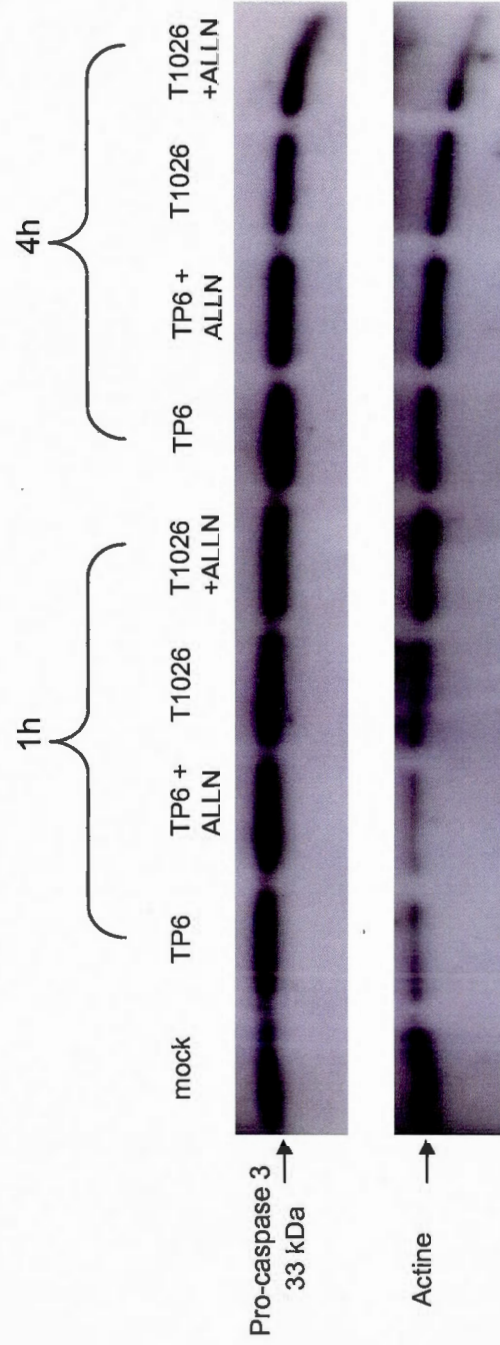


**Figure 11: L'inhibition de la calpaïne a peu d'effet lors de la phase précoce de l'infection par T1026.** Les cellules H4 ont été non-traitées (mock) ou infectées avec T1026 avec une m.o.i. de 10, avec ou sans ALLN 25  $\mu$ M. L'ALLN est un inhibiteur de la calpaïne. Les photos ont été prises 1h et 4h p.i. (B et C) Aucun changement n'a lieu à 1h p.i. (D et E) De légers changements apparaissent à 4h p.i. sans effet marqué de l'ALLN.



**Figure 12: L'inhibition de la calpaïne n'a pas d'effet significatif sur la viabilité des cellules lors de la phase précoce de l'infection par T1026.** Les cellules H4 ont été non traitées (mock) ou infectées par T1026 avec ou sans ALLN. L'ALLN est un inhibiteur de la calpaïne. Un test MTS-PMS a été effectué chaque heure, de 1h à 4h p.i. La D.O. représente la viabilité de la culture cellulaire. Les résultats montrent peu d'effet dus à l'ALLN.





**Figure 13: La caspase-3 reste stable dans la phase précoce de l'infection par TP6 et T1062.** Les cellules H4 ont été non-traitées (mock), traitées à l'ALLN 25  $\mu$ M et/ou infectées par TP6 ou T1026. Les extraits protéiques totaux ont été récoltés 1h et 4h p.i., séparés par électrophorèse (SDS-PAGE) et transférés sur PVDF. La pro-caspase-3 est révélée à l'aide d'anticorps spécifiques. L'ALLN est un inhibiteur de la calpaïne. L'actine sert de témoin de chargement. Les résultats montrent la stabilité de la pro-caspase 3 lors des phases précoces de l'infection par TP6 et T1026.

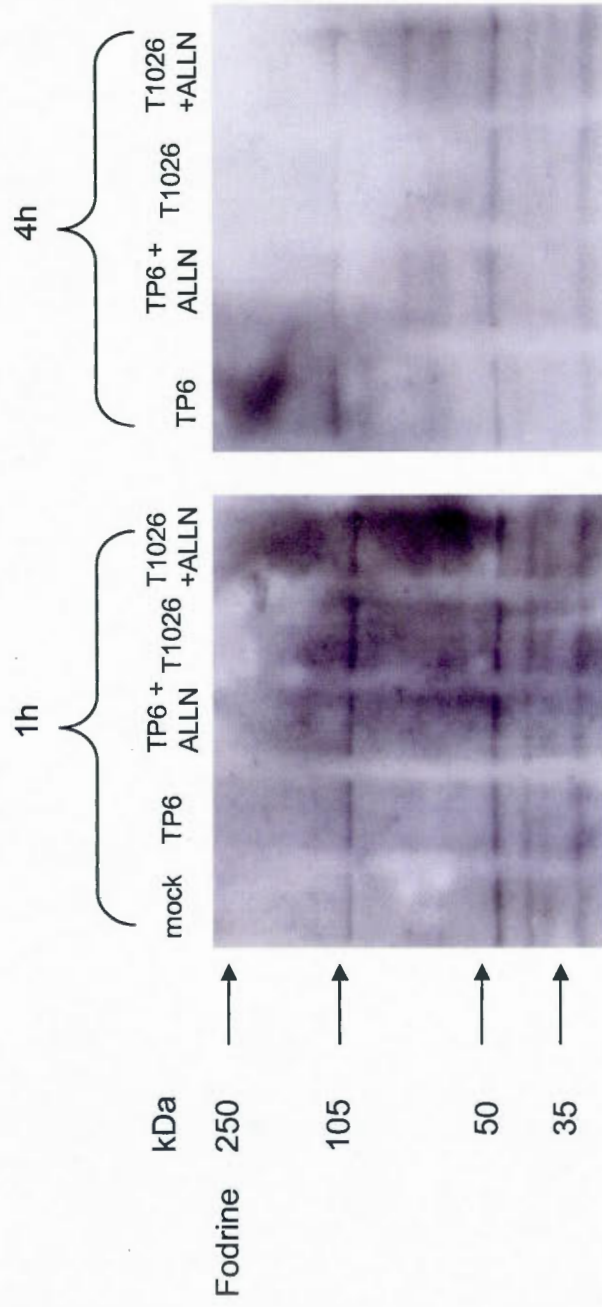
calpaïne, elle donne, lors d'une analyse par immunobuvardage, un doublet de bandes spécifique de 145-150 kDa. Les cellules H4 infectées par TP6 et T1026, avec ou sans ALLN, ont donc été récoltées et lysées 1h et 4h p.i. de manière à en extraire les protéines totales. L'analyse Western de ces extraits totaux a été effectuée à l'aide d'un anticorps spécifique à la fodrine. La figure 14 montre toutefois que cette protéine du cytosquelette n'est pas détectable dans les cellules H4 à 1h et 4h p.i., pas plus dans sa forme complète (240 kDa) que sous sa forme clivée par la calpaïne (145-150 kDa).

### **3.6 La forme classique de la fodrine n'est pas exprimée dans les cellules neurales humaines de type H4.**

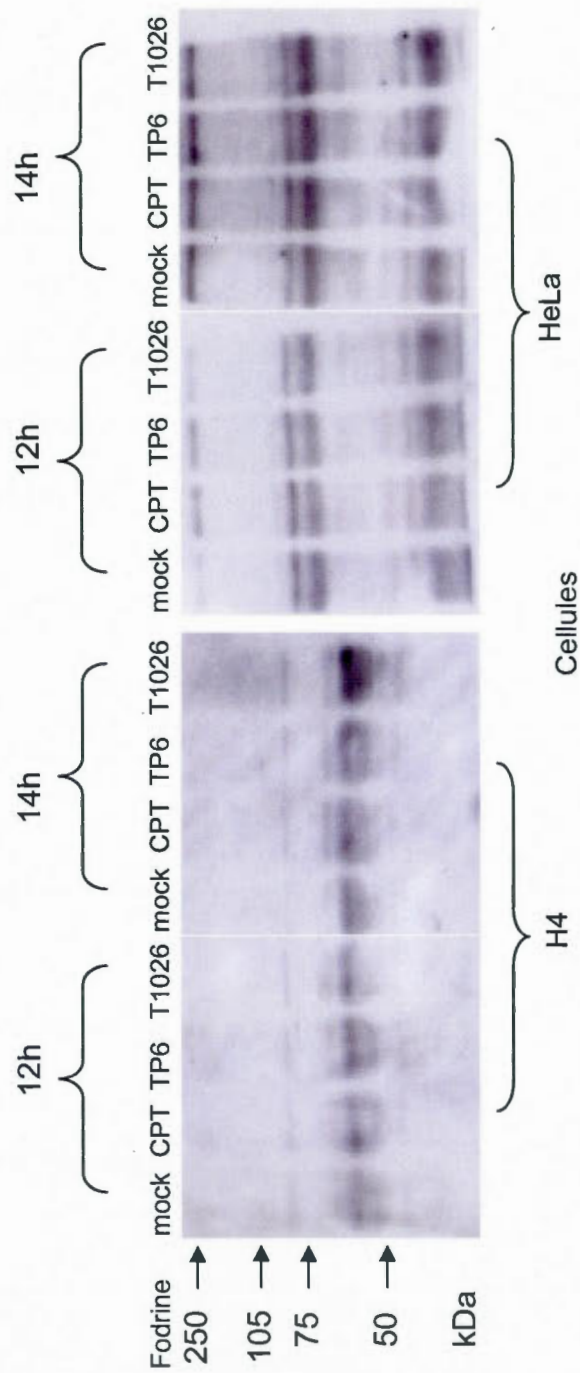
Étant donné l'absence d'une bande à 240 kDa lors de l'immunobuvardage pour la fodrine à 1h et 4h p.i., il a été nécessaire de vérifier si cette protéine du cytosquelette pouvait se retrouver à un autre moment lors de l'infection des cellules H4, tout en les comparant avec un autre type cellulaire humain, des fibroblastes de type HeLa. Les deux types de cellules ont donc subi le même traitement, soit une infection par les deux variants TP6 et T1026, ainsi qu'un témoin d'apoptose chimique, la camptothécine. Les protéines totales ont été extraites et l'analyse par immunobuvardage a été effectuée grâce à un anticorps spécifique à la fodrine, le même que celui utilisé pour la figure 14. Les résultats obtenus présentés dans la figure 15 montrent clairement que la fodrine est absente des cellules H4 sous sa forme détectable par cet anticorps alors que les cellules HeLa présentent une bande à 240 kDa spécifique de la protéine de cytosquelette.

### **3.7 La calpaïne reste stable lors de la phase tardive de l'infection par le VSV.**

La calpaïne étant directement dépendante de la concentration en calcium cytosolique, il est normal de chercher son activation dans la phase précoce de l'infection par le VSV, étant donné le stress membranaire causé par l'attachement



**Figure 14: Absence de la forme classique de la fodrine dans les cellules H4 entre 1h et 4h p.i.**  
 Les cellules H4 ont été non-traitées (mock) et infectées avec TP6 ou T1026 à une m.o.i. de 10, avec ou sans ALLN 25  $\mu$ M. Les extraits protéiques totaux ont été récoltés 1h et 1h p.i., séparés par électrophorèse (SDS-PAGE) et transférés sur PVDF. La fodrine est révélée à l'aide d'anticorps spécifiques. L'ALLN est un inhibiteur chimique de la calpaïne. Les résultats montrent l'absence de la forme classique (240 kDa) de la fodrine dans les cellules H4.



**Figure 15: Absence de la forme classique de la fodrine dans les cellules H4.** Les cellules H4 et HeLa ont été non-traitées (mock), traitées à la camptothécine (CPT) 50 nM ou infectées avec TP6 ou T1026 à une m.o.i. de 10. Les extraits protéiques totaux ont été récoltés 12h et 14h p.i., séparés par électrophorèse (SDS-PAGE) et transférés sur PVDF. La fodrine est révélée à l'aide d'anticorps spécifiques. La camptothécine (CPT) est un inducteur chimique d'apoptose et sert de témoin. Les résultats montrent l'absence de la forme classique (240 kDa) de la fodrine dans les cellules H4 par rapport aux cellules HeLa.

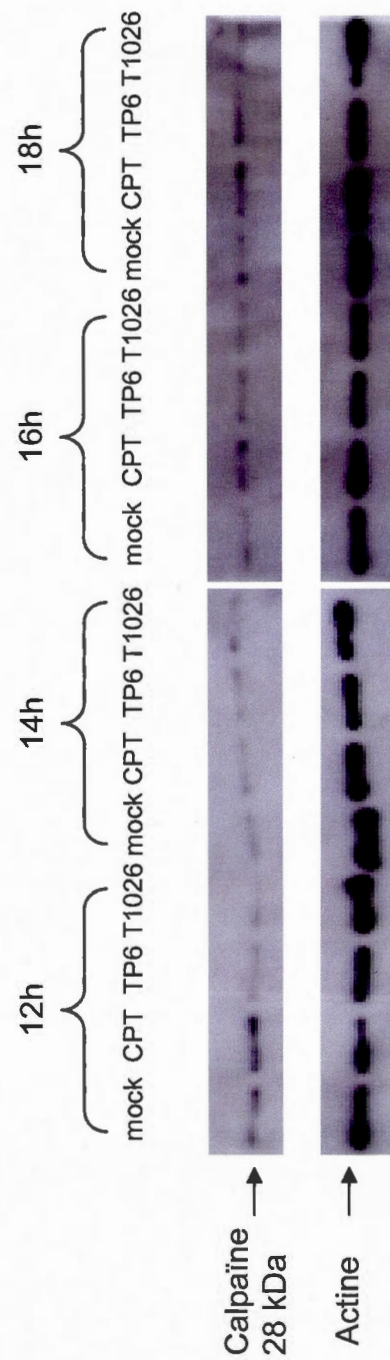
du virion à la membrane. Toutefois, au cours de l'induction d'apoptose, d'autres facteurs peuvent influencer sur la concentration en calcium cytosolique. Il a d'ailleurs été montré que la calpaïne peut être associée à l'induction d'apoptose par voie mitochondriale, voie impliquée dans l'infection par le VSV. Elle peut dans ce cas participer au clivage de Bax et donc à l'action pro-apoptotique de sa forme clivée de 18 kDa.

Les cellules H4 ont donc été infectées par TP6 et T1026 puis récoltées toutes les deux heures entre 12h et 18h p.i. Les extraits protéiques totaux ont ensuite été analysés par immunobuvardage grâce à un anticorps spécifique à la calpaïne. Les résultats présentés à la figure 16 montrent que la calpaïne ne subit pas de variations lors de la phase tardive de l'infection par TP6 et T1026, comparativement au témoin cellulaire non infecté. Toutefois, les bandes obtenues pour mock 12h et CPT 12h (figure 16) paraissent plus marquées que les autres, mais il est probable que ce ne soit là qu'un artéfact dû à la manipulation.

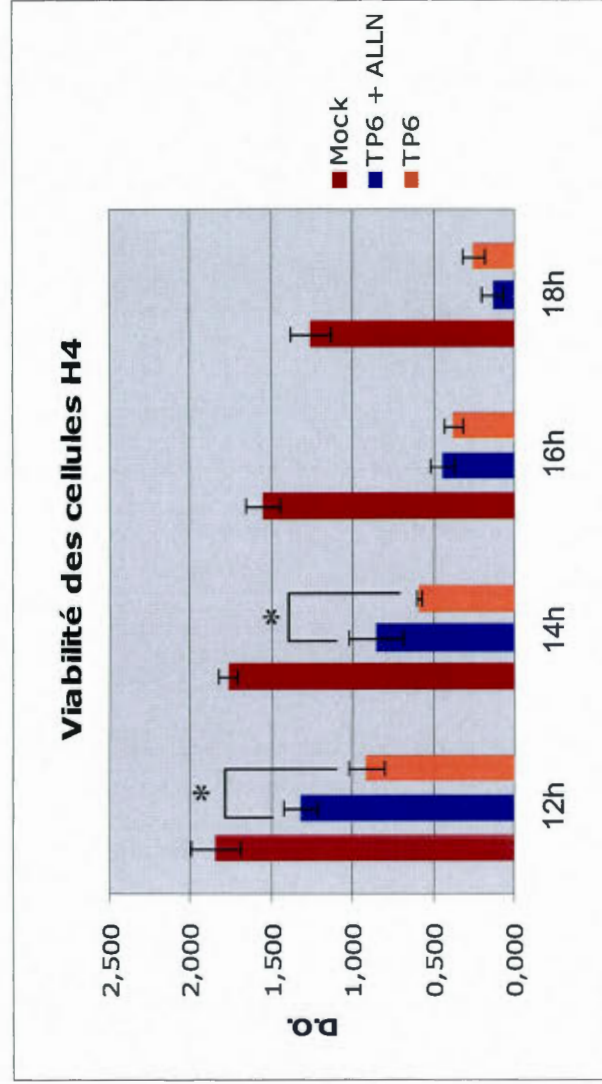
### **3.8 L'inhibition de la calpaïne à peu d'effet lors de la phase tardive de l'infection par le VSV.**

Comme il été montré auparavant (figure 10), la calpaïne est impliquée dans la mortalité cellulaire induite par TP6 tôt dans l'infection. Afin de vérifier pendant combien de temps l'inhibition de la calpaïne peut influencer la viabilité d'une culture infectée, un test MTS/PMS a été effectué sur des cellules infectées par TP6 ou T1026, traitées ou non à l'ALLN, mais cette fois entre 12h et 18h p.i. La figure 17 montre les résultats obtenus pour TP6 et il est possible d'y voir une baisse de la viabilité au cours du temps pour tous les tests effectués. Toutefois, les cellules infectées par TP6 et non traitées à l'ALLN présentent une mortalité de loin plus élevée que le témoin. Lors de l'utilisation d'ALLN, les résultats présentés sur la figure 17 montrent que l'inhibition de la calpaïne a encore un léger effet positif sur la viabilité de la culture à 12h et 14h p.i. Toutefois, à partir de 16h p.i. cet inhibiteur n'est plus en mesure de contrer la mortalité induite par TP6 sur les cellules H4.



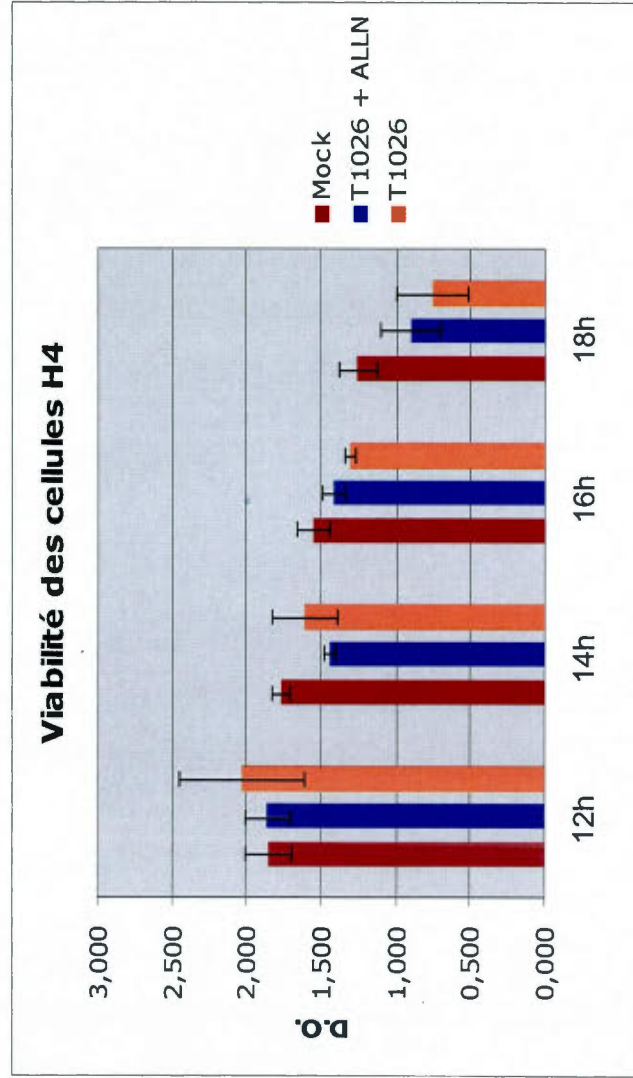


**Figure 16: Stabilité de la calpaïne lors de la phase tardive de l'infection par TP6 et T1026.** Les cellules H4 ont été non-traitées (mock), traitées à la camptothécine (CPT) 50 nM ou infectées par TP6 ou T1026 à une m.o.i de 1. Les extraits protéiques totaux ont été récoltés aux deux heures, de 12h à 18h p.i., séparés par électrophorèse (SDS-PAGE) et transférés sur PVDF. La calpaïne et l'actine sont révélés à l'aide d'anticorps spécifiques. La camptothécine (CPT) est un inducteur chimique d'apoptose et sert de témoin. L'actine est le témoin de chargement. Les résultats montrent la stabilité de la petite sous-unité active de la calpaïne lors de la phase tardive de l'infection.



**Figure 17: L'inhibition de la calpaïne a une faible influence sur la viabilité des cellules infectées par TP6 lors de la phase tardive de l'infection.** Les cellules H4 ont été non traitées (mock) ou infectées par TP6 avec ou sans ALLN. L'ALLN est un inhibiteur de la calpaïne. Un test MTS-PMS a été effectué chaque heure, de 12h à 18h p.i. La D.O. représente la viabilité de la culture cellulaire. Les résultats montrent une faible survie des cellules infectées en présence d'ALLN à 12h et 14h p.i., mais aucun effet significatif à 16h et 18h p.i. L'astérisque montre une différence statistiquement significative.

Dans le cas de T1026 (figure 18), il n'est pas possible de déceler de différence significative dans la baisse de viabilité entre les différents traitements infligés aux cellules H4 en culture. En effet, les valeurs de D.O. obtenues par le test MTS/PMS entre 12h et 18h p.i. baissent au cours du temps pour tous les tests sans qu'il y ait d'effet marqué de l'infection par T1026 ou de l'inhibition de la calpaïne.



**Figure 18: L'inhibition de la calpaïne à une faible influence sur la viabilité des cellules lors de la phase tardive de l'infection par T1026.** Les cellules H4 ont été non traitées (mock) ou infectées par T1026 avec ou sans ALLN. L'ALLN est un inhibiteur de la calpaïne. Un test MTS-PMS a été effectué chaque heure, de 12h à 18h p.i. La D.O. représente la viabilité de la culture cellulaire. Les résultats ne montrent pas d'effet significatif sur la survie des cellules infectées en présence d'ALLN entre 12h et 18h p.i.

# Chapitre IV

## Discussion

### 4.0 Variations dans le patron d'infection entre TP6 et T1026

Le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) présente, comme il en a été discuté précédemment, des caractéristiques permettant d'étudier son rôle lors de l'induction d'apoptose dans des cellules cultivées *in vitro*. Parmi les protéines issues de son génome, la protéine de la matrice (M) est considérée comme un facteur majeur dans l'induction de la mort cellulaire programmée des cellules infectées (Kopecky *et al*, 2001). D'un autre côté, différents variants du VSV sont à la disposition des chercheurs, porteurs de différentes mutations, dont la plus intéressante porte sur la protéine M. En effet, une modification de cette protéine entraîne des changements radicaux dans la dynamique de l'infection par le VSV, que ce soit en rapport avec le type cellulaire considéré ou dans l'induction d'apoptose elle-même (Kopecky et Lyles, 2003). Pour cette raison, les variants TP6 (sauvage pour M) et T1026 (mutant en M 51) constituent un modèle des variations dans l'induction d'apoptose dues à une mutation sur la protéine de la matrice. Le variant TP6 présente une cytopathicité élevée, induisant *in vitro* l'apoptose dans 100% des cellules neurales de type H4 dans les 72 heures (Desforges *et al*, 2002) alors que T1026 est plus lent à induire la mort des cellules infectées et peut éventuellement persister dans le système nerveux (Barrera et Letchworth, 1996).

L'induction d'apoptose a été ici vérifiée dans le cas de ces deux variants. La figure 1 montre bien que la voie mitochondriale est impliquée dans la mort cellulaire, de par l'apparition de la forme clivée de Bax (18 kDa). Ce fragment clivé présente un pouvoir pro-apoptotique élevé et est impliqué dans la sortie de cytochrome c (Cyt c) de la mitochondrie (Oh *et al*, 2004). Ce clivage commence à apparaître lors de la phase tardive de l'infection, soit entre 12h et 18h p.i. Comme attendu, la portion de 18 kDa de Bax est plus abondante à ces temps dans le cas de TP6 que de T1026.



Cela vient confirmer que la voie mitochondriale est activée lors de l'infection par ces deux variants, mais à des niveaux différents, T1026 étant un inducteur d'apoptose moins puissant que TP6.

D'un autre côté, l'induction d'apoptose a été vérifiée en regardant l'activation de la caspase-3. Cette protéine a été identifiée comme une protéase clé dans l'apoptose (Blomgren *et al*, 2001) et se retrouve en fin de cascade apoptotique, pouvant être activée par différentes voies cellulaires (El-Deiry, W.S., 2005). La figure 2 présente l'analyse par immunobuvardage de la pro-caspase-3 lors de l'infection par TP6 et T1026, ainsi que l'analyse densitométrique des bandes obtenues. Il est possible d'y remarquer une forte diminution de la pro-caspase-3, correspondant à son clivage et à l'activation de la caspase-3 (Jin et El-Deiry, 2005), dans le cas des deux variants considérés, comparativement aux cellules témoin non-infectées. L'analyse densitométrique montre que ce clivage de la pro-caspase-3 est équivalent pour TP6 et T1026 à 16h et 18h p.i. alors qu'une variation entre ces deux variants aurait été plus probable. Toutefois, l'activation de la caspase-3 pouvant résulter de différentes voies, cela va de pair avec le fait que les deux mutants n'induisent pas l'apoptose de la même manière chez les cellules H4, mais que dans les deux cas cela aboutisse à une activation de cette caspase effectrice.

Comme mentionné précédemment, TP6 et T1026 n'ont pas le même impact sur les cellules infectées. Afin de vérifier cela, la morphologie et la viabilité des cellules à différents temps post-infection a été mesurée à l'aide d'un test MTS/PMS. Les figures 6 et 7 montrent les résultats obtenus dans le cas de TP6. La figure 6 (B et D) montre que ce variant du VSV est en effet hautement cytopathique. Les cellules infectées deviennent très arrondies et se séparent de leur substrat dès la quatrième heure d'infection, ce qui confirme l'action rapide et prononcée de ce variant. La figure 7 appuie les observations morphologiques en montrant une chute de viabilité très prononcée pour l'infection par TP6 en comparaison des cellules contrôle. L'effet drastique de ce virus sur la forme et la survie des cellules est donc confirmé, et l'implication d'une protéase, la calpaïne, dans ces effets sera discutée

plus loin. La rapidité de ce virus à atteindre les fonctions cellulaires reste toutefois inexpliquée. Les études préalables ne fournissent pas d'indices sur une voie métabolique pouvant expliquer un effet aussi précoce et dévastateur, et de nouvelles recherches devront tenter de l'expliquer.

Le mutant pour l'acide aminé 51 de la protéine M, T1026, est quant à lui bien moins impressionnant dans les effets morphologiques induits sur les cellules. En effet, la figure 8 ne montre pas de différence marquée entre les cellules infectées par ce variant et les cellules contrôles. Les différentes photographies montrent un tapis cellulaire intact et des cellules adhérentes étalées sur leur substrat. Cela confirme une fois de plus la plus grande faiblesse de T1026 à induire des effets marqués sur les cellules infectées. De la même manière, la baisse de viabilité associée à l'infection est bien moindre que pour TP6, comme le montre la figure 9. Sur cette figure, seule la viabilité à 4h p.i. commence à être légèrement marquée.

Le rôle prépondérant de la protéine M dans les effets cytopathiques associés à l'infection par le VSV est donc appuyé par les résultats présents. Le virus mutant pour cette protéine est moins efficace et moins rapide que le virus sauvage, autant dans l'atteinte à la morphologie cellulaire que dans l'induction d'apoptose lors de la phase précoce de l'infection (1h-4h p.i.). Cela est confirmé par les résultats présentés dans les figures 14 et 15, sur lesquelles on montre que la baisse de viabilité lors de la phase tardive de l'infection (12h-18h p.i.) est bien plus prononcée en ce qui concerne TP6 que T1026.

La voie apoptotique mitochondriale, représentée par le clivage de Bax, est également plus importante dans le cas de TP6, mais l'activation de la caspase-3 est équivalente pour les deux variants. Cela suggère que ces deux virus sont impliqués dans des voies métaboliques divergentes. Comme l'ont montré Desforges *et al* en 2002, l'utilisation de molécules anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 et d'inhibiteurs pan-caspases ne permet pas de garantir la survie des cultures cellulaires infectées. D'autres voies apoptotiques sont donc impliquées dans

l'infection par TP6 et T1026 chez les cellules neurales humaines. De plus en plus de modèles considèrent la calpaïne comme un mécanisme effecteur possible dans l'apoptose induite par un virus (DeBiasi *et al*, 1998, 2000).

#### 4.1 Le rôle de la calpaïne

La calpaïne est une protéase dont l'activation est dépendante du calcium cytosolique. Elle se retrouve dans tous les types cellulaires eucaryotes et est impliquée dans de nombreuses voies cellulaires comme l'attachement entre le cytosquelette et la membrane (morphologie cellulaire), de même que dans l'apoptose (Goll *et al*, 2003). De nombreuses études ont montré son implication lors d'une infection virale comme dans le cas du réovirus (DeBiasi *et al*, 1999, 2001). La régulation de son activité reste encore floue dans de nombreux cas, mais il a été montré dans différents modèles qu'elle a une implication importante dans les cellules neurales étant donné sa dépendance au calcium cytosolique (Altnauer *et al*, 2004; Emgard *et al*, 2002; Goll *et al*, 2003; Neumar *et al*, 2003). Cette protéase joue un rôle important au niveau de la morphologie des cellules. Ayant comme substrat une protéine du cytosquelette, la fodrine (Blomgren *et al*, 2001; DeBiasi *et al*, 2001; Emgard *et al*, 2002), elle peut, une fois activée, influencer l'aspect d'une cellule en clivant cette protéine.

#### 4.2 La localisation de la calpaïne

Étant donné l'effet de TP6 sur la morphologie des cellules infectées, la présence et l'activation de la calpaïne a été recherchée. L'analyse par immunobuvardage de la calpaïne dans les cellules infectées par TP6 montre que la petite sous-unité (28 kDa) de cette protéine se retrouve dans la fraction cytosolique des cellules H4 (figure 3) à 12h et 16h p.i. Sur cette figure, il est possible de voir une diminution de la bande à 28 kDa entre TP6 et les cellules témoin. Cela est représentatif d'une autolyse de la petite sous-unité correspondant à l'activation de la calpaïne au cours de l'infection. Toutefois, le tampon de lyse utilisé pour fractionner

les échantillons protéiques en fractions mitochondriale et cytosolique (tampon digitonine) a pu avoir une influence sur ce clivage, ce qui rend hasardeux l'interprétation de ce résultat et pourrait expliquer une variation entre 12h et 16h p.i. Un autre type de fractionnement devrait être utilisé pour s'en assurer. La seule présence de cette protéase dans les cellules utilisées permet toutefois d'aller vérifier sa possible implication dans l'infection par le VSV.

#### 4.3 L'activation de la calpaïne

Pour avoir une confirmation de l'activation de la calpaïne, une autre analyse par immunobuvardage a été effectuée sur des extraits protéiques totaux de cellules H4 infectées par TP6 et T1026. Ce premier test a été effectué lors de la phase précoce (1h et 4h p.i.) de l'infection virale pour les raisons exposées ci-après. Lors de l'attachement d'un virion à une cellule, un stress est causé au niveau de la membrane plasmique. Ce stress peut être la cause d'une augmentation de la concentration en calcium cytosolique, nécessaire à l'activation de la calpaïne, mais cette augmentation se mesure en secondes (Cheshenko *et al*, 2003). Dans d'autres cas, cette protéase est activée très tôt après un dommage causé à la cellule et montre des pics d'activité dans les quatre premières heures (Emgard *et al*, 2002). Les résultats obtenus pour l'immunobuvardage de la calpaïne à 1h et 4h p.i. sont présentés à la figure 7. Ils montrent clairement que la sous-unité de 28 kDa diminue, ayant subi l'activation par autolyse, dès la première heure p.i. pour TP6, mais également à 4h p.i. dans le cas de T1026. Cela confirme l'hypothèse que la calpaïne est impliquée dans l'infection par le VSV et peut donc ainsi être impliquée dans l'action du VSV, tant au niveau morphologique que dans la mort cellulaire. Le retard dans l'autolyse montré pour T1026 par rapport à TP6 vient une fois de plus appuyer les divergences déjà exposées entre ces deux variants.

#### 4.4 La concentration en calcium cytosolique

L'attachement d'un virion pouvant causer un stress membranaire et la calpaïne étant activée tôt dans l'infection par VSV, il est intéressant de regarder si la concentration en calcium cytosolique est affectée lors de l'infection par le VSV. Les cellules H4 infectées ont donc été traitées pour mesurer au FACScan la fluorescence du calcium cytosolique. La figure 5 présente les résultats obtenus, mais ne montre pas de variation significative concernant le calcium dans le cas de TP6 et T1026. Néanmoins, cela ne suffit pas à mettre en doute l'activation de la calpaïne. En effet, la variation de calcium lors d'un stress membranaire peut avoir lieu dans des microdomaines de la membrane plasmique faisant, par exemple, le lien entre la membrane plasmique, le cytosquelette et le RE. La fodrine plus particulièrement peut former un lien entre la membrane plasmique et le RE au niveau de ces microdomaines (Lencesova *et al*, 2004). La détection d'une variation de la concentration en calcium cytosolique dans un de ces domaines devient donc ardue à mettre en évidence et peut avoir lieu pendant un court laps de temps et à des endroits bien spécifiques. L'activation de la calpaïne peut donc avoir lieu et cette protéase jouera son rôle dans le clivage du cytosquelette et donc dans l'atteinte à la morphologie de la cellule.

#### 4.5 Les changements morphologiques

La spécificité de la calpaïne pour la fodrine en fait une cible pour identifier les causes des modifications morphologiques engendrées par le VSV. La fodrine est attachée à la membrane plasmique et se retrouve donc en périphérie de la cellule considérée, particulièrement dans les microdomaines de la membranes plasmiques ou les échanges ioniques sont importants (Lencesova *et al*, 2004). Lors d'une infection virale, le stress causé à la membrane plasmique peut permettre l'activation de la calpaïne dans la région proche de la membrane. La fodrine est donc disponible pour l'activité enzymatique de la calpaïne.



S'il est difficile de montrer une augmentation en calcium cytosolique, l'utilisation d'un inhibiteur de la calpaïne, l'ALLN, permet de mettre en évidence le rôle de cette protéase sur la morphologie cellulaire au cours de l'infection par le VSV. Les observations des photos présentées à la figure 6 montrent que les cellules infectées par TP6 sont arrondies et se sont détachées de leur substrat dès la quatrième heure (figure 6D). Les cellules soumises à la même infection mais traitées à l'ALLN (figure 6E) ont gardé l'intégrité du tapis cellulaire et présentent une forme moins arrondie et plus proche du contrôle cellulaire. Cela montre clairement que la calpaïne intervient au niveau des modifications morphologiques induites par TP6 lors de la phase précoce de l'infection et confirme l'activation de la calpaïne tôt dans l'infection montré à la figure 4. La fodrine semble donc être clivée par la calpaïne lors de l'infection par TP6, ce qui sera discuté plus loin.

En ce qui concerne T1026, les effets de l'infection virale sont très peu prononcés lors de la phase précoce de l'infection. La figure 8 ne montre que peu de cellules arrondies à 4h p.i. alors que le tapis cellulaire est conservé (figure 8D). L'inhibition de la calpaïne par l'ALLN n'offre donc pas d'observation pertinente quant à l'activité de la calpaïne aussi tôt dans l'infection pour le virus mutant. Tout comme le montre la figure 4, l'autolyse de la calpaïne est moindre que pour TP6, ce qui confirme la plus faible cytopathicité de T1026.

#### **4.6 La fodrine**

Étant donné les résultats présentés sur la figure 6, il est clair que la calpaïne est activée lors de l'infection par TP6 et qu'elle agit de façon précoce sur la morphologie cellulaire. La cible principale de la calpaïne au niveau du cytosquelette est, comme mentionné ci-dessus, la fodrine. Afin de déterminer de façon précise l'action de la calpaïne sur la cytosquelette, une analyse par immunobuvardage a été effectuée, en utilisant un anticorps spécifique à la fodrine. En effet, la clivage de la

fodrine pleine longueur (240 kDa) par la calpaïne fournit un doublet spécifique à 145-150 kDa (Blomgren *et al*, 2001; Emgard *et al*, 2002).

Pour rester en phase avec les résultats présentés sur les figures 4 et 6, le clivage de la fodrine a été recherché de 1h à 4h p.i. La figure 11 montre qu'il est impossible de détecter le doublet 145-150 kDa lors de l'infection, pas plus qu'il n'est possible de voir la forme pleine longueur de la fodrine dans les cellules H4, même pour le témoin mock. Cette protéine semblant donc être absente de ce type cellulaire, une seconde analyse par immunobuvardage a été effectuée, à des temps différents (12h et 14h p.i.), de manière à comparer le type cellulaire H4 à un autre type de cellules humaines, les fibroblastes HeLa. La figure 12 montre bien que, dans les cellules HeLa, la forme pleine longueur de la fodrine à 240 kDa est présente à 12h et 14h p.i., sans qu'il y ait apparition de doublet spécifique au clivage par la calpaïne. Cela confirme l'hypothèse que l'activité de cette protéase est particulièrement importante au niveau des cellules neurales (Blomgren *et al*, 2001 et McCollum *et al*, 2002), comme les SH-SY5Y (Reimertz *et al*, 2001). D'un autre côté, le patron obtenu pour les cellules H4 est différent entre la phase précoce (figure 14) et la phase tardive (figure 15). Cela peut s'expliquer par une modification de certaines protéines cellulaires au cours de l'infection, celles que l'anticorps reconnaît de façon non-spécifique. Toutefois, il est clair que les cellules H4 présentent une modification au niveau de la séquence de la fodrine, la rendant impossible à détecter en utilisant un anticorps commercial spécifique de la forme classique de cette protéine. Cela rend donc son utilisation impossible comme témoin de l'activation de la calpaïne. Une autre souche de cellules neurales pourrait être utilisée pour conserver la fodrine comme témoin. Sinon, un autre témoin devra être utilisé.

#### **4.7 La caspase-3 comme témoin**

Étant donné que la fodrine est absente sous sa forme classique des cellules étudiées, un autre témoin peut être utilisé pour montrer l'activation de la calpaïne. La caspase-3 est elle aussi un substrat de la calpaïne et peut donc servir lors d'une

analyse par immunobuvardage à déterminer si la calpaïne est active dans les cellules considérées. En effet, la pro-forme de la caspase-3 (33 kDa) peut être dégradée en une portion de 29 kDa spécifique de l'action de la calpaïne (Blomgren *et al*, 2001; Emgard *et al*, 2002). La figure 10 montre le test effectué sans toutefois présenter de bande à 29 kDa comme attendu. Cela semble donc infirmer l'activation de la calpaïne entre 1h et 4h dans les cellules H4 infectées par TP6, contrairement aux résultats obtenus sur la figure 6 par l'utilisation d'un inhibiteur. Toutefois, comme mentionné dans le cas du calcium cytosolique, il est possible que ce ne soit que la forme de la calpaïne associée à la membrane plasmique qui soit activée, dans des zones précises de la membrane plasmique (microdomaines) et ne soit ainsi pas en contact direct avec une protéine cytosolique comme la caspase-3.

#### 4.8 Viabilité cellulaire

Au delà des effets drastiques sur la morphologie cellulaire induits par TP6, ce variant agit également sur la viabilité des cellules. Son action comme fort et rapide inducteur d'apoptose a déjà été discutée ci-dessus. De manière à corréler les modifications dans l'allure des cellules et la viabilité de la culture atteinte, un test MTS/PMS a été effectué sur les cellules infectées par TP6 et T1026, tout en utilisant un inhibiteur de la calpaïne, l'ALLN. Cela permet de voir si, au-delà du rôle de cette protéase sur la structure cellulaire, elle peut intervenir dans la mortalité induite par le VSV. Les tests ont été effectués entre 1h et 4h p.i.

La figure 7 montre les résultats obtenus pour TP6. Il est intéressant d'y remarquer l'augmentation de la vitalité de la culture témoin (mock) au cours des quatre premières heures, alors que les cellules infectées par TP6 voient leur viabilité chuter drastiquement. Même en considérant la puissante action apoptotique de ce variant, il est étonnant, compte tenu des études précédentes, de voir une augmentation de la mortalité aussi rapide dans la phase précoce de l'infection, bien que des expériences répétées aient fourni des données semblables. Une fois de plus, de nouvelles expériences seront nécessaires à éclaircir ce phénomène. En

effet, le test de viabilité MTS/PMS ayant fourni ces résultats est basé sur l'activité mitochondriale des cellules testées. Il est possible que les infections aient produit une baisse passagère du métabolisme mitochondrial. En observant la figure 17, il semble que la mortalité à 12h p.i. ne soit plus aussi forte qu'à 4h p.i. ce qui laisse penser qu'une faible partie de la réponse observée à 4h p.i n'est pas directement liée à la mortalité cellulaire.

Le point le plus pertinent des résultats présentés sur la figure 7 est l'effet de l'ALLN, non seulement sur la morphologie cellulaire, mais également sur la viabilité des cellules infectées. En effet, l'inhibition de la calpaïne permet de conserver une viabilité semblable aux cellules témoin au cours des trois premières heures de l'infection, et de voir encore une différence significative entre les cellules non-traitées à l'ALLN et les cellules traitées à l'inhibiteur au cours de la quatrième heure d'infection. Cela vient appuyer le fait que la calpaïne est activée lors de la phase précoce de l'infection par TP6, même si son action n'a pas pu être montrée sur l'un de ses substrats (fodrine ou caspase-3). La voie empruntée par cette protéase reste toutefois inconnue dans ce cas et devra être montrée ultérieurement. Il est également important de noter que si l'inhibition de la calpaïne ne semble plus avoir d'effet de sauvegarde dans la phase tardive de l'infection, cela peut être dû à un manque de stabilité de l'ALLN. Si c'est le cas, d'autres inhibiteurs devront être testés pour montrer le rôle de cette protéase tout au long de l'infection.

#### **4.9 Le clivage de Bax**

Considérant que la voie mitochondriale est l'une des voies empruntées lors de l'induction d'apoptose par le VSV (Desforges *et al*, 2002), et que Bax est impliquée au cours de l'infection (figure 1), il est possible d'y voir un rôle joué par la calpaïne. En effet, cette dernière peut participer à la voie apoptotique intrinsèque en participant au clivage de Bax en une portion de 18 kDa. Cette forme clivée constitue une molécule pro-apoptotique aussi puissante que la forme pleine longueur et peut être obtenue suite à l'action de la calpaïne, lui permettant ainsi de participer à cette

voie d'apoptose (Oh *et al*, 2004). Comme le montre la figure 1, l'infection par le VSV induit un clivage de Bax pleine longueur en un fragment de 18 kDa lors de la phase tardive de l'infection. Il est possible de considérer que ce clivage est dû à l'action de la calpaïne, pouvant être effectué suite à l'activation de cette protéase (Oh *et al*, 2004).

Considérant que le clivage de Bax en une forme de 18 kDa a eu lieu de manière tardive, il est intéressant de vérifier si la calpaïne peut être activée également plus tard dans l'infection. Pour ce faire, une analyse par immunobuvardage de cette protéase a été effectuée entre 12h et 18h p.i. sur des cellules infectées par les deux variants du VSV. La figure 13 montre les résultats obtenus, mais ne donne pas d'indication que la calpaïne soit activée tardivement dans l'infection par TP6 ou T1026. La petite-sous unité de 28 kDa se retrouve dans tous les échantillons en quantité égale et ne présente pas de diminution pouvant être due à l'autolyse et donc l'activation de la protéase. D'un autre côté, la figure 14 montre que l'effet protecteur de l'inhibition de la calpaïne par l'ALLN est perdu au cours du temps. À 12h et 14h p.i. il présente encore une très légère amélioration de la survie des cellules infectées par TP6, ce qui se perd dès la seizième heure et au-delà. Cela confirme l'hypothèse voulant que la calpaïne soit activée tôt dans l'infection, subséquemment au stress membranaire causé par l'attachement du virion à la membrane plasmique de la cellule considérée. Le clivage tardif de Bax peut toutefois être une conséquence de l'activation précoce de la calpaïne, le mécanisme liant ces deux molécules étant encore flou.

En ce qui concerne T1026, son action, autant au niveau morphologique que sur la survie des cellules reste faible lors des premières heures de l'infection (figures 8 et 9). La figure 9 consiste en un test MTS/PMS en présence et absence d'ALLN lors de l'infection par le mutant T1026. Il est clair que ce dernier a une action bien moins marquée que TP6 sur les cellules et la viabilité des cellules ne s'en retrouve affectée qu'à partir de la quatrième heure d'infection. L'utilisation de l'inhibiteur de la calpaïne n'a pas d'effet significatif sur la survie de la culture cellulaire, pas plus qu'il



n'en avait sur les changements morphologiques lors de la phase précoce de l'infection. En regardant les phases plus tardives de l'infection, il n'est pas possible de voir une activation de la calpaïne lors de l'infection par T1026 entre 12h et 18h p.i. (figure 13) et la viabilité des cellules n'est pas affectée par l'utilisation d'ALLN. Il faut toutefois remarquer que la survie des cellules n'est déjà que faiblement atteinte par l'infection virale au cours des phases tardives de l'infection (figure 15). Cela confirme la plus faible et plus lente induction d'apoptose par ce variant viral, et sa capacité de persistance peut être mise en cause. Il est donc difficile de déterminer une activation de calpaïne dans le cas de T1026 étant donné les faibles effets de ce virus sur les cellules considérées.

#### **4.10 Conclusion**

Ces résultats suggèrent que la calpaïne est impliquée dans les changements morphologiques et l'apoptose induits par TP6, mais pas par T1026, lors de la phase précoce de l'infection. Il est également probable que la calpaïne soit impliquée dans la voie apoptotique mitochondriale, de par sa capacité à agir au niveau de Bax. Elle ne constitue donc pas un élément indépendant dans l'induction d'apoptose mais peut agir en augmentant une voie en particulier. D'un autre côté, les différences obtenues entre les deux variants viraux suggèrent que la protéine de la matrice (M) du VSV, sauvage chez TP6 et mutante chez T1026, joue un rôle dans l'activation de la calpaïne. La mutation présente sur la protéine de la matrice de T1026 agit donc sur la capacité du virus à activer la calpaïne lors de l'infection. Cette hypothèse devra être vérifiée par la suite.

## Références

- AHMED, M. and LYLES, D. S. (1998). Effect of vesicular stomatitis virus matrix protein on transcription directed by host RNA polymerases I, II, and III. *J Virol* **72**, 8413-9.
- ALTZNAUER, F., CONUS, S., CAVALLI, A., FOLKERS, G., and SIMON, H. U. (2004). Calpain-1 regulates Bax and subsequent Smac-dependent caspase-3 activation in neutrophil apoptosis. *J Biol Chem* **279**, 5947-57.
- ARMSTRONG, J. S. (2006). Mitochondrial membrane permeabilization: the sine qua non for cell death. *Bioessays* **28**, 253-60.
- BALACHANDRAN, S., POROSNICU, M., and BARBER, G. N. (2001). Oncolytic activity of vesicular stomatitis virus is effective against tumors exhibiting aberrant p53, Ras, or myc function and involves the induction of apoptosis. *J Virol* **75**, 3474-9.
- BALL, L. A. (2001). Replication strategies of RNA viruses. *Dans Fundamental Virology*. 4<sup>ème</sup> Édition. Éditeurs : D. M. Knipe et P. M. Howley. Lippincott Williams & Wilkins. pp 105-118.
- BAO, J. J., LE, X. F., WANG, R. Y., YUAN, J., WANG, L., ATKINSON, E. N., LAPUSHIN, R., ANDREEFF, M., FANG, B., YU, Y., and BAST, R. C. Jr (2002). Reexpression of the tumor suppressor gene ARHI induces apoptosis in ovarian and breast cancer cells through a caspase-independent calpain-dependent pathway. *Cancer Res* **62**, 7264-72.
- BARBER, G. N. (2004). Vesicular stomatitis virus as an oncolytic vector. *Viral Immunol* **17**, 516-27.
- BARRERA, J. C. and LETCHWORTH, G. J. (1996). Persistence of vesicular stomatitis virus New Jersey RNA in convalescent hamsters. *Virology* **219**, 453-64.
- BLOMGREN, K., ZHU, C., WANG, X., KARLSSON, J. O., LEVERIN, A. L., BAHR, B. A., MALLARD, C., and HAGBERG, H. (2001). Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia: a mechanism of "pathological apoptosis"? *J Biol Chem* **276**, 10191-8.
- BLONDEL, D., HARMISON, G. G., and SCHUBERT, M. (1990). Role of matrix protein in cytopathogenesis of vesicular stomatitis virus. *J Virol* **64**, 1716-1725.

BOTH, G. W., MOYER, S. A. and BANERJEE, A. K. (1975). Translation and identification of the viral mRNA species isolated from subcellular fraction of vesicular stomatitis virus-infected cells. *J Virol* **15**, 1012-9.

CHESHENKO, N., DEL ROSARIO, B., WODA, C., MARCELLINO, D., SATLIN, L. M., and HEROLD, B. C. (2003). Herpes simplex virus triggers activation of calcium-signaling pathways. *J Cell Biol* **163**, 283-93.

CONDIT, R. C. (2001). Principles of virology. *Dans Fundamental Virology*. 4<sup>ème</sup> Édition. Éditeurs : D. M. Knipe et P. M. Howley. Lippincott Williams & Wilkins. pp 19-51

CROW, M. T., MANI, K., NAM, Y. J., and KITSIS, R. N. (2004). The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. *Circ Res* **95**, 957-70.

DEBIASI, R. L., EDELSTEIN, C. L., SHERRY, B., and TYLER, K. L. (2001). Calpain inhibition protects against virus-induced apoptotic myocardial injury. *J Virol* **75**, 351-61.

DEBIASI, R. L., SQUIER, M. K., PIKE, B., WYNES, M., DERMODY, T. S., COHEN, J. J., and TYLER, K. L. (1999). Reovirus-induced apoptosis is preceded by increased cellular calpain activity and is blocked by calpain inhibitors. *J Virol* **73**, 695-701.

DESFORGES, M., CHARRON, J., BERARD, S., BEAUSOLEIL, S., STOJDL, D. F., DESPARS, G., LAVERDIERE, B., BELL, J. C., TALBOT, P. J., STANNERS, C. P., and POLIQUIN, L. (2001). Different host-cell shutoff strategies related to the matrix protein lead to persistence of vesicular stomatitis virus mutants on fibroblast cells. *Virus Res* **76**, 87-102.

DESFORGES, M., DESPARS, G., BERARD, S., GOSSELIN, M., MCKENZIE, M. O., LYLES, D. S., TALBOT, P. J., and POLIQUIN, L. (2002). Matrix protein mutations contribute to inefficient induction of apoptosis leading to persistent infection of human neural cells by vesicular stomatitis virus. *Virology* **295**, 63-73.

DIMAIO, D. and COHEN, D. M. (2001). Replication strategies of DNA viruses. *Dans Fundamental Virology*. 4<sup>ème</sup> Édition. Éditeurs : D. M. Knipe et P. M. Howley. Lippincott Williams & Wilkins. pp119-132.

EMGARD, M., BLOMGREN, K., and BRUNDIN, P. (2002). Characterisation of cell damage and death in embryonic mesencephalic tissue: a study on ultrastructure, vital stains and protease activity. *Neuroscience* **115**, 1177-87.

GAJKOWSKA, B., WOJEWODZKA, U., and GAJDA, J. (2004). Translocation of Bax and Bid to mitochondria, endoplasmic reticulum and nuclear envelope : possible control points in apoptosis. *J Mol Histol* **35**, 11-9.

- GOLL, D. E., THOMPSON, V. F., LI, H., WEI, W., and CONG, J. (2003). The calpain system. *Physiol Rev* **83**, 731-801.
- GUPTA, S., SU, H., BI, R., AGRAWAL, S., and GOLLAPUDI, S. (2005). Life and death of lymphocytes: a role in immunesenescence. *Immun Ageing* **2**, 12.
- HUANG, Y. and WANG, K. K. (2001). The calpain family and human disease. *Trends Mol Med* **7**, 355-62.
- HUNEYCUTT, B. S., PLAKHOV, I. V., SHUSTERMAN, Z., BARTIDO, S. M., HUANG, A., REISS, C. S., and AOKI, C. (1994). Distribution of vesicular stomatitis virus proteins in the brains of BALB/c mice following intranasal inoculation: an immunohistochemical analysis. *Brain Res* **635**, 81-95.
- HUNTER, E. (2001). Virus assembly. *Dans Fundamental Virology*. 4<sup>ème</sup> Édition. Éditeurs : D. M. Knipe et P. M. Howley. Lippincott Williams & Wilkins. pp 171-197.
- JEETENDRA, E., GHOSH, K., ODELL, D., LI, J., GHOSH, H. P., and WHITT, M. A. (2003). The membrane-proximal region of vesicular stomatitis virus glycoprotein G ectodomain is critical for fusion and virus infectivity. *J Virol* **77**, 12807-18.
- JIN, Z. and EL-DEIRY, W. S. (2005). Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther* **4**, 139-63.
- KITAMURA, Y., MIYAMURA, A., TAKATA, K., INDEN, M., TSUCHIYA, D., NAKAMURA, K., and TANIGUCHI, T. (2003). Possible involvement of both endoplasmic reticulum-and mitochondria-dependent pathways in thapsigargin-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Pharmacol Sci* **92**, 228-36.
- KNIPE, D. M., SAMUEL, C. E. and PALESE, P. (2001). Virus-host cell interactions. *Dans Fundamental Virology*. 4<sup>ème</sup> Édition. Éditeurs : D. M. Knipe et P. M. Howley. Lippincott Williams & Wilkins. pp 133-170.
- KOPECKY, S. A. and LYLES, D. S. (2003). Contrasting effects of matrix protein on apoptosis in HeLa and BHK cells infected with vesicular stomatitis virus are due to inhibition of host gene expression. *J Virol* **77**, 4658-69.
- KOPECKY, S. A., WILLINGHAM, M. C., and LYLES, D. S. (2001). Matrix protein and another viral component contribute to induction of apoptosis in cells infected with vesicular stomatitis virus. *J Virol* **75**, 12169-81.
- LENCESOVA, L., O'NEILL, A., RESNECK, W. G., BLOCH, R. J., and BLAUSTEIN, M. P. (2004). Plasma membrane-cytoskeleton-endoplasmic reticulum complexes in neurons and astrocytes. *J Biol Chem* **279**, 2885-93.
- LICATA, J. M. and HARTY, R. N. (2003). Rhabdoviruses and apoptosis. *Int Rev*

*Immunol* **22**, 451-76.

MANDIC, A., HANSSON, J., LINDER, S., and SHOSHAN, M. C. (2003). Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling. *J Biol Chem* **278**, 9100-6.

MCCOLLUM, A. T., NASR, P., and ESTUS, S. (2002). Calpain activates caspase-3 during UV-induced neuronal death but only calpain is necessary for death. *J Neurochem* **82**, 1208-20.

OH, S. H., LEE, B. H., and LIM, S. C. (2004). Cadmium induces apoptotic cell death in WI 38 cells via caspase-dependent Bid cleavage and calpain-mediated mitochondrial Bax cleavage by Bcl-2-independent pathway. *Biochem Pharmacol* **68**, 1845-55.

OLDSTONE, M. B. (1991). Molecular anatomy of viral persistence. *J Virol* **65**, 6381-6.

PLAKHOV, I. V., ARLUND, E. E., AOKI, C., and REISS, C. S. (1995). The earliest events in vesicular stomatitis virus infection of the murine olfactory neuroepithelium and entry of the central nervous system. *Virology* **209**, 257-62.

RAJGOPAL, Y. and VEMURI, M. C. (2002). Calpain activation and alpha-spectrin cleavage in rat brain by ethanol. *Neurosci Lett* **321**, 187-91.

RAO, R. V., POKSAY, K. S., CASTRO-OBREGON, S., SCHILLING, B., ROW, R. H., DEL RIO, G., GIBSON, B. W., ELLERBY, H. M., and BREDESEN, D. E. (2004). Molecular components of a cell death pathway activated by endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* **279**, 177-87.

REIMERTZ, C., KOGEL, D., LANKIEWICZ, S., POPPE, M., and PREHN, J. H. (2001). Ca(2+)-induced inhibition of apoptosis in human SH-SY5Y neuroblastoma cells: degradation of apoptotic protease activating factor-1 (APAF-1). *J Neurochem* **78**, 1256-66.

ROBERTS, A., BUONOCORE, L., PRICE, R., FORMAN, J., and ROSE, J. K. (1999). Attenuated vesicular stomatitis viruses as vaccine vectors. *J Virol* **73**, 3723-32.

ROSE, J. K. and WHITT, M. A. (2001). *Rhabdoviridae: the viruses and their replication. Dans Fundamental Virology. 4<sup>ème</sup> Édition. Éditeurs: D. M. Knipe et P. M. Howley. Lippincott Williams & Wilkins. pp 665-688.*

SEN, G. C. and RANSOHOFF, R. M. (1993). Interferon-induced antiviral actions and their regulation. *Adv Virus Res* **42**, 57-102.

STARK, G. R., KERR, I. M., WILLIAMS, B. R., SILVERMAN, R. H., and SCHREIBER, R. D. (1998). How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* **67**,



227-64.

WANG, X. J. and XU, J. X. (2005). Possible involvement of  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in rotenone-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett* **376**, 127-32.

WARING, P. (2005). Redox active calcium ion channels and cell death. *Arch Biochem Biophys* **434**, 33-42.

WHITTON, J. L. and OLDSTONE, M. B. A. (2001). The immune response to viruses. *Dans Fundamental Virology*. 4<sup>ème</sup> Édition. Éditeurs : D. M. Knipe et P. M. Howley. Lippincott Williams & Wilkins. pp 285-320.

WINGRAVE, J. M., SCHAECHER, K. E., SRIBNICK, E. A., WILFORD, G. G., RAY, S. K., HAZEN-MARTIN, D. J., HOGAN, E. L., and BANIK, N. L. (2003). Early induction of secondary injury factors causing activation of calpain and mitochondria-mediated neuronal apoptosis following spinal cord injury in rats. *J Neurosci Res* **73**, 95-104.

YAKOVLEV, A. G. and FADEN, A. I. (2004). Mechanisms of neural cell death: implications for development of neuroprotective treatment strategies. *NeuroRx* **1**, 5-16.

YOUNG, J. A. T. (2001). Virus entry and uncoating. *Dans Fundamental Virology*. 4<sup>ème</sup> Édition. Éditeurs : D. M. Knipe et P. M. Howley. Lippincott Williams & Wilkins. pp 87-103.